

**Ubiquitin-Modifikation
der Synaptobrevine SNC1 und SNC2
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

2004

vorgelegt von
Diplom-Biologin Edith Oberhofer
Österreich

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, den 25.8.2004

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juni 1999 und Juli 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt und am 6. September 2004 der Fakultät für Biologie zur Beurteilung vorgelegt.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2004

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Jentsch

Prof. Dr. Charles David

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Stefan Jentsch bedanken, der durch seine enthusiastische und zugleich kritische Natur wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Charles David für die Begutachtung und das Interesse an dieser Arbeit.

Bei meinen Laborkollegen möchte ich mich ganz besonders bedanken, die da sind: Sigurd Braun, für die gute Zusammenarbeit. Sebastian Rumpf, für die vielen interessanten Diskussionen und das geduldige Lesen dieser Arbeit. Manuela Kost, für Ihre hervorragende technische Arbeit und viele gemeinsame Mittagessen.

Außerdem danke ich ganz herzlich Sibylle Jäger, kritische Leib-und-Seele Wissenschaftlerin und wunderbare Freundin, von der ich vieles lernen durfte und darf.

Mein größter Dank gilt natürlich meinem Lebenspartner Martin und unserem Sohn Valentin, für Ihr Verständnis während des manchmal nervenaufreibenden Laboralltags.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	2
1. Das Ubiquitin-System	2
1.1 Enzymatik des Ubiquitinsystems	2
1.2 Multiubiquitin versus Monoubiquitin	4
1.3 Erkennung von Ubiquitin durch Ubiquitin-Bindemodule	5
2. Die klassische Funktion des Ubiquitin-Konjugationssystems ist die Erkennung und Regulation durch das Proteasom	6
2.1 Abbau von Ubiquitin-Konjugaten durch das Proteasom	6
2.2 Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems	6
3. Neue „nicht-klassische“ Funktionen des Ubiquitin-Systems regulieren Lokalisation und Aktivität der Substratproteine	8
3.1 Funktion von Ubiquitin in der Endozytose	8
3.2 Funktion von Ubiquitin im Vesikeltransport	10
3.3 Funktion von Ubiquitin in der DNA-Reparatur	11
4. Ubiquitin und Fusion von Membranen	12
ZIELSETZUNG	16
ERGEBNISSE	17
1. Die Charakterisierung der Ubiquitylierung der v-SNAREs SNC1/SNC2	17
1.1 SNC1 und SNC2 besitzen sechs konservierte Lysin-Reste	17
1.2 N-terminal HA/Myc markiertes SNC1/SNC2 sind funktionell	19
1.3 SNC1/SNC2 wird mit Ubiquitin modifiziert	20
1.4 SNC2 wird am Lysin-63 ubiquityliert	22
1.5 SNC1/SNC2 wird oligoubiquityliert	25
1.6 Die Ubiquitylierung von SNC1 ist abhängig von RSP5	26
2. Ubiquitylierung ist ein Signal für Lokalisierung	27
2.1 Die Bildung des <i>trans</i> -SNARE Komplexes wird durch die Modifikation am Lysin-63 nicht beeinflusst	27
2.2 SNC2 ist ein langlebiges Protein	28
2.3 Lokalisation von GFP-SNC1 deuten auf Regulation durch die Vakuole	29
2.4 Ubiquityliertes SNC1 befindet sich an der Plasmamembran	29
2.5 Für die Lokalisierung von SNC1 in die Plasmamembran ist funktionelles RSP5 notwendig	34
2.6 SNC1-K63R lokalisiert in der Vakuolenmembran	35
2.7 Membranfraktionierung von SNC1	37
3. Die Interaktion von SNC1 mit dem UBA-Domänen Protein DDI1	39
3.1 Die genetische Interaktion von DDI1 und SNC1/SNC2	39
3.2 Zwei-Hybrid Interaktion von DDI1 mit Ubiquitin und RSP5	41
3.3 UBA-Domänen von DDI1 und EDE1 binden an ubiquitylierte Substrate	42

DISKUSSION	44
1. SNAREs werden ubiquityliert	44
2. UBA-Domänen erkennen ubiquitylierte Substrate	47
3. Die Bedeutung der SNARE-Ubiquitylierung für die lysosomale Erkennung	48
4. Die Bedeutung der SNARE-Ubiquitylierung für die Fusion von Membranen	50
MATERIAL UND METHODEN	53
1. Material	53
2. Molekularbiologische Methoden	57
3. Mikrobiologische Methoden	59
4. Proteinbiochemische Methoden	62
LITERATUR	67

Zusammenfassung

Der Großteil der in eukaryontischen Zellen ablaufenden chemischen Reaktionen finden in Zellkompartimenten statt, die durch Membranen eingeschlossen werden. SNARE-Proteine sind essentielle Komponenten für die Fusion von gleichartigen (homotypischen) als auch verschiedenartigen (heterotypischen) Membranen. SNAREs sind meist über eine C-terminale Transmembran-Domäne in der „Geber“-Membran verankert. N-terminale 60-70 Aminosäuren lange Hepta-Peptide (SNARE-Motiv) können über Coiled-Coil Formierung den Kontakt mit einem SNARE an der „Empfänger“-Membran herstellen (*trans*-SNARE Komplex).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmamembran SNAREs SNC1 und SNC2 in *Saccharomyces cerevisiae* auf posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Ubiquitylierung an mindestens zwei Lysinen im Substrat erfolgt. Die kovalente Verknüpfung erfolgt durch die Ubiquitin-Ligase RSP5.

In Mutanten, die die Sekretion von SNC1/SNC2 zur Plasmamembran inhibieren (*sec17-1*, *sec18-1*, *sed5-1* und *sec1-1*), liegen die SNAREs in nicht-modifizierter Form vor. In den Endozytose-Mutanten *end3* und *end4*, die für die Invagination von endozytotischen Vesikeln defekt sind, akkumuliert ubiquityliertes SNC1 an der Plasmamembran. Die Ubiquitylierungs-Reaktion muß daher an der Plasmamembran erfolgen. Eine der Ubiquitylierungsstellen, Lysin-63, befindet sich in der Coiled-Coil-Domäne der SNAREs. Der Austausch des Lysins durch ein Arginin an dieser Stelle führt dazu, dass SNC1 nicht mehr in das Lumen der Vakuole lokalisiert wird. Stattdessen verbleibt das Protein in der Membran der Vakuole.

Die zweite Ubiquitylierungsstelle konnte noch nicht identifiziert werden. Das Ubiquitin-Bindeprotein DDI1 interagiert mit SNC1/SNC2, und beeinflusst die Verfügbarkeit des SNAREs für den *trans*-SNARE Komplex. Ob DDI1 über die interne UBA (ubiquitin-associated)-Domäne mit ubiquityliertem SNC1/SNC2 interagiert, ist noch unbekannt.

Einleitung

Zellen müssen auf Umwelteinflüsse schnell und in angemessener Form reagieren können. Dazu werden Proteine in ihrer Aktivität, Lokalisierung oder Quantität durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Diese Regulation kann durch posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung oder Modifikation mit Lipiden geschehen.

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation ist die posttranslationale Modifikation eines Proteins durch Ubiquitin. Die klassische Funktion der Ubiquitylierung ist die Markierung des Zielproteins mit Ubiquitin für den selektiven Proteinabbau durch das Proteasom, ein multikatalytischer Proteasekomplex.

Während der letzten Jahre wurden weitere, „nicht-klassische“ Funktionen der kovalenten Verknüpfung eines Substrates mit Ubiquitin beschrieben, die das so konjugierte Protein nicht dem proteasomalen Abbau zuführen. Eines der bekanntesten Beispiele für eine solche „nicht-klassische“ Funktion ist die Rolle der Ubiquitylierung in der Endozytose. Hier führt die Konjugation von Ubiquitin an Membranproteine zum Transport des so markierten Proteins von der Plasmamembran, über endozytotische Vesikel in Lysosomen. Die Membranproteine werden durch lysosomale Proteasen abgebaut.

1. Das Ubiquitin-System

1.1 Enzymatik des Ubiquitinsystems

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein. Für die Ubiquitylierung von Substratproteinen wird zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substrates eine Isopeptidbindung ausgebildet. Diese Verknüpfung kann auch zwischen den Ubiquitinmolekülen selbst erfolgen, was zur Ausbildung von Multiubiquitinketten führt. Die Ubiquitylierung ist eine reversible Reaktion, die durch Ubiquitin-Hydrolasen rückgängig gemacht werden kann (Wilkinson et al. 1998; Pickart 2001; Yao et al. 2002).

Im ersten Schritt der Ubiquitylierungsreaktion wird die Carboxyl-Gruppe des Ubiquitins in Abhängigkeit von ATP aktiviert. Dies katalysiert in *Saccharomyces cerevisiae*, wie in der Mehrzahl aller Eukaryonten, ein einziges Enzym, UBA1 (ubiquitin-activating enzyme 1; E1). Dazu wird ein Thioester zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und dem konservierten Cysteinrest des aktiven Zentrums von UBA1 ausgebildet (Ciechanover et al. 1982; Haas et al. 1983; Pickart et al. 1988; Pickart et al. 1994). Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin in einer Umesterungsreaktion auf einen Cysteinrest des Ubiquitin-Konjugations Enzyms (E2) übertragen. In *S. cerevisiae* existieren elf E2-Proteine. Meist benötigen E2-Proteine zusätzliche Faktoren, die Ubiquitin-Ligasen (E3), um eine spezifische Ubiquitylierungsreaktion zu vermitteln.

Einleitung

Ubiquitin-Ligasen sind weitverbreitete, oft modular aufgebaute Proteine oder Proteinkomplexe, die sowohl das Substrat als auch das erforderliche E2-Protein erkennen können (Jackson et al. 2000). Es werden zwei Klassen von Ubiquitin-Ligasen unterschieden: HECT E3s und RING-Finger E3s.

Die HECT (Homologous to E6-AP-C-terminus)-E3-Enzyme besitzen eine konservierte, C-terminale HECT-Domäne, die erstmals im Protein E6-AP beschrieben wurde (Huibregtse et al. 1995; Scheffner et al. 1995). *S. cerevisiae* verfügt über fünf E3 Enzyme dieser Klasse, von denen allein RSP5 lebensnotwendig ist. Die Substraterkennung der HECT-E3-Enzyme erfolgt über nicht konservierte N-terminale Substratbindungs-Domänen. In RSP5 sind dies WW-Domänen, die prolinreiche Sequenzmotive erkennen können (Lu et al. 1999; Chang et al. 2000).

Die Proteine der Klasse der RING-Finger- oder RING-Finger-ähnlichen E3-Enzyme kommen monomer oder in hochmolekularen Komplexen vor. Der RING-Finger fungiert als Plattform zur Bindung des E2-Proteins. Andere Domänen des Proteins, beziehungsweise andere Untereinheiten des Komplexes, rekrutieren die Substrate (Xie et al. 1999; Joazeiro et al. 2000). RING-Finger gehen im Unterschied zu HECT-E3s keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein.

In manchen Fällen wirken zusätzliche Multiubiquitylierungs-Faktoren (E4). In Hefe konnte diese Aktivität dem Protein UFD2 zugeschrieben werden (Koegl et al. 1999). UFD2 wurde als Bindungspartner eines oligoubiquitylierten Substrats isoliert und fördert *in vitro* und *in vivo* dessen Multiubiquitylierung (Johnson et al. 1995; Koegl et al. 1999). UFD2 besitzt eine C-terminale U-box-Domäne, die strukturell mit dem RING-Finger Motiv verwandt ist.

Der Mechanismus der Ubiquitylierung läßt sich als hierarchisch organisierte enzymatische Kaskade beschreiben, in deren Verlauf Ubiquitin sequentiell aktiviert und spezifisch auf ein Substrat übertragen wird (Abbildung 1-1).

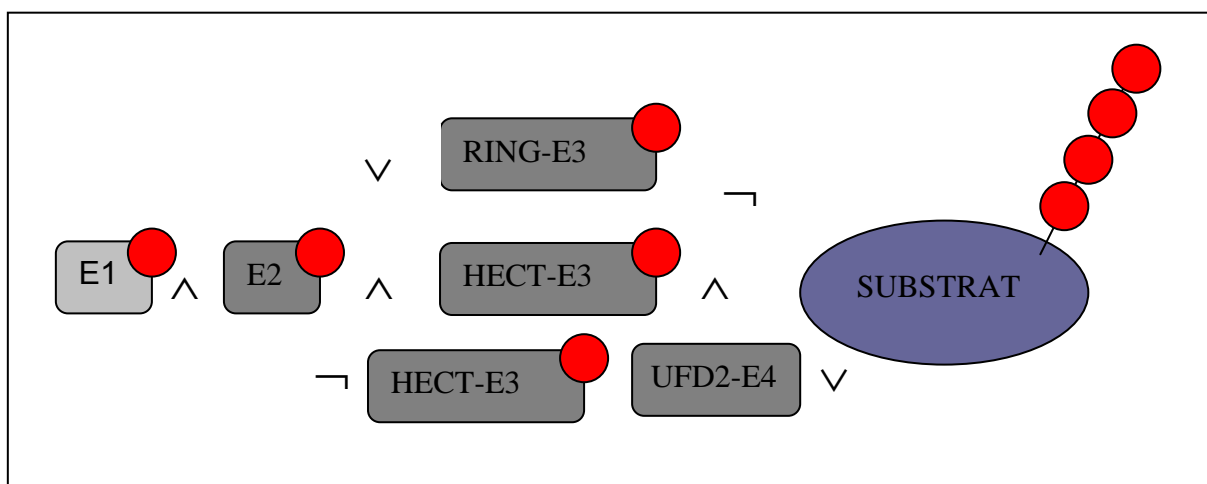


Abbildung 1-1: Spezifische Ubiquitylierung von Substratproteinen bedarf einer enzymatischen Kaskade von E1-, E2-, E3- (RING- oder HECT-E3) und in manchen Fällen von E4-Enzymen. * Ubiquitin.

1.2 Multiubiquitin versus Monoubiquitin

Ubiquitylierung führt häufig zur Bildung so genannter Ubiquitinketten (Multiubiquitylierung), in denen einzelne Ubiquitinmoleküle über verschiedene Lysine im Ubiquitin selbst miteinander verknüpft werden. Proteine können auch nur monoubiquityliert werden. Es ist auch möglich, dass das Substratprotein an mehreren Stellen in der Polypeptidkette monoubiquityliert wird. Die zentrale Frage für das Verstehen der Regulation von Proteinen ist, wie die unterschiedlichen Verknüpfungsarten von Ubiquitin an Substrate durch ubiquitinspezifische Rezeptoren erkannt werden können.

Die Art der Verknüpfung hat für das Substrat verschiedenste Konsequenzen (Abbildung 1-2). Multiubiquitylierte Substrate, die durch Verknüpfung am ubiquitininternen Lys-48 oder Lys-29 entstehen, führen zur proteasomalen Erkennung und Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System. Im Gegensatz dazu dient die Monoubiquitylierung nicht als Erkennungssignal für das Ubiquitin/Proteasom-System, sondern für die Regulation des Substrats. Die Regulationsmöglichkeiten sind vielfältig. Ubiquitylierung von Histonen und Transkriptionsfaktoren können die Aktivität des jeweiligen Substrats verändern (Jentsch et al. 1987; Hoppe et al. 2000). Die Monoubiquitylierung kann ein essentielles Element für die Aktivierung der DNA-Reparatur sein (Hoege et al. 2002), als auch als Internalisationssignal an der Plasmamembran dienen (Galan et al. 1997; Hicke 2001).

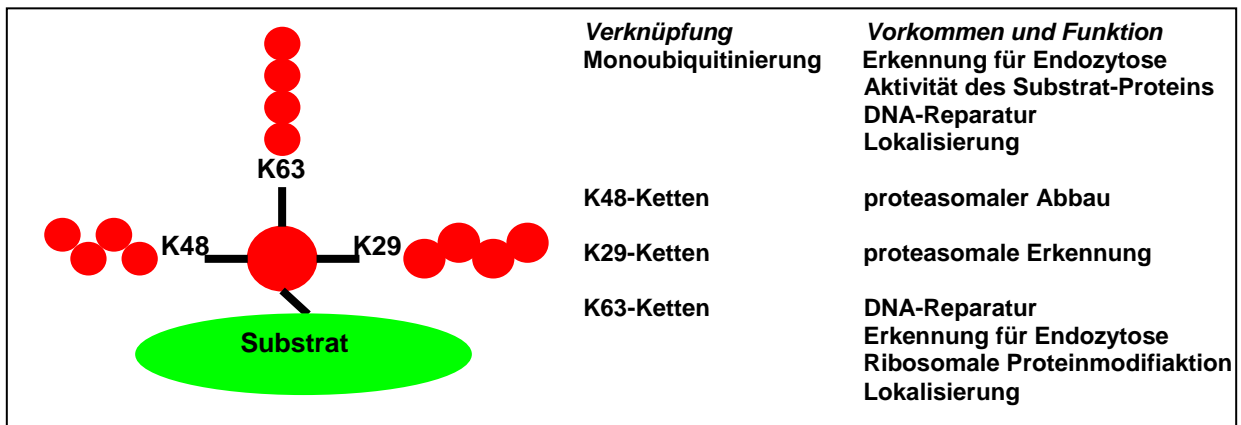


Abbildung 1-2: Ubiquitin kann als Monomer oder Kette mit Substraten verknüpft werden. Die Verknüpfung der Ketten kann über K29-, K48- oder K63-Lysine erfolgen. Die Funktionen der Ubiquitylierung sind unterschiedlich.

Die Rolle der Monoubiquitylierung für den intrazellulären Transport ist am besten im sekretorischen und endozytotischen Weg erforscht. Die weitere Sortierung von Plasmamembranrezeptoren in Multivesikuläre Teilchen (MVB) ist abhängig von Monoubiquitylierung (Katzmann et al. 2002). Auch im *trans*-Golgi Netzwerk kann Mono- und Oligoubiquitylierung über die Sortierung der Substrate in Lysosomen/Vakuole entscheiden (Helliwell et al. 2001; Soetens et al. 2001). Vertreter der endozytotischen Maschinerie, zum Beispiel Epsine, werden monoubiquityliert und damit in ihrer Aktivität reguliert (Shih et al. 2002). Endozytotische Substrate können durch Lys-63 verknüpftes Di-Ubiquitin modifiziert sein (Galan et al. 1997).

1.3 Erkennung von Ubiquitin durch Ubiquitin-Bindemodule

Rezeptoren, die das konjugierte Ubiquitin erkennen können, bestimmen über das weitere Schicksal der Substrate. Verschiedene Ubiquitin-Bindemodule, die Monoubiquitin und Multiubiquitinketten erkennen, werden heute unterschieden: UEV (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant), NZF (Npl4 zinc finger) UBA (ubiquitin-associated), UIM (ubiquitin-interacting motif) und CUE (Tabelle 1).

Für die Erkennung von Ubiquitin durch Rezeptoren wirkt die Oberfläche des Ubiquitin selbst als dreidimensionales Signal. So bildet zum Beispiel Leu-8, Ile-44, Val-70 eine hydrophobe Region auf der Ubiquitin-Oberfläche, die die von der Proteasom-Untereinheit S5a/Rpn10 erkannt wird (Beal et al. 1996). Diese hydrophobe Region zusammen mit einer Region in der Nähe von Phe-4 sind zugleich für den endozytotischen Transport und das vegetative Wachstum in *Saccharomyces cerevisiae* notwendig (Sloper-Mould et al. 2001).

Ubiquitin-Binde-Domäne	Repräsentative Proteine	Länge	Struktur	Art der Bindung an Ubiquitin	Referenzen
UEV	TSG101/VPS36, MMS2/UEV1a	145	E2-ähnliche Domäne	verschiedene	VanDemark et al. 2001 Pornillos et al. 2002
NZF	VPS36 NPL4	35	Zinkfinger, 4 anti-parallele β -Stränge	Hydrophobe Interaktion mit Ubiquitin (Ile44-Kluster)	Meyer et al. 2002 Wang et al. 2003
UBA	RAD23, DSK2, EDE1, DDI1, SHP1	44-55	Drei α -Helices	Bindung über das Ile44 Cluster von Ubiquitin; ähnlich zu CUE1	Hofmann et al. 1996 Mueller et al. 2002 Kang et al. 2003
UIM	S5a/RPN10, Hrs, EPS15, STAM, MEKK1	20	Amphipathische α -Helix	Bindung über das Ile44 Cluster von Ubiquitin	Hofmann et al. 2001 Fisher et al. 2003
CUE	VPS9, Tollip	42-43	Drei α -Helices	Hydrophobe Interaktion mit Ubiquitin (Ile44-Kluster)	Ponting et al. 2000 Kang et al. 2003 Prag et al. 2003 Shih et al. 2003

Tabelle 1: Ubiquitinbinde-Domänen (nach Schnell et al. 2003).

2. Die klassische Funktion des Ubiquitin-Konjugationssystems ist die Erkennung und Regulation durch das Proteasom

2.1 Abbau von Ubiquitin-Konjugaten durch das Proteasom

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, im Zytosol und Zellkern, der aus einem 20S-Kernpartikel und zwei axialen 19S-Regulorkappen besteht (Baumeister et al. 1998). Das 20S-Kernpartikel bildet aus vier gestapelten Ringen mit je sieben zueinander homologen Untereinheiten einen hohlen Zylinder (Groll et al. 1997). Die 19S-Regulorkappe besteht in *S. cerevisiae* aus annähernd 18 Proteinen (Glickman et al. 1998). Die Funktion dieser Kappe ist unter anderem die Erkennung der Multiubiquitinketten (van Nocker et al. 1996). Zwei Proteine mit dieser Ubiquitin Bindefunktion sind RPN10 und die AAA-ATPase RPT5. Im Gegensatz zu RPT5 verliert RPN10 durch Inkorporation in das 26S-Proteasom seine hohe Ubiquitinaffinität. RPT5 wird daher neben RPN10 als neuer proteasomaler Akzeptor ubiquitylierter Proteine angesehen (Elsasser et al. 2002; Lam et al. 2002). Neben RPT5 und RPN10, die Bestandteil des Proteasoms sind, werden lösliche Ubiquitin-Rezeptoren der RAD23 Familie (RAD23, DSK2), für die proteasomale Erkennung verantwortlich gemacht.

Nach Erkennung des Substrats durch die 19S-Regulorkappe erfolgt die Einschleusung des Substrats in den 20S-Zylinder. Dabei wird das Substrat in Peptide mit einer Länge von etwa 10 Aminosäuren zerlegt. In der Regel degradiert das 26S-Proteasom Proteine, die über eine mindestens vier Moleküle lange Ubiquitinkette verfügen (Chau et al. 1989; Thrower et al. 2000). Zur Wiederverwertung von Ubiquitin wird die Ubiquitinkette durch eine Ubiquitin-Hydrolase abgespalten, und zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen zerlegt (Wilkinson et al. 1998; Verma et al. 2002; Yao et al. 2002).

2.2 Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Eine der zentralen Funktionen des Ubiquitin/Proteasom-Systems ist die Eliminierung von abnormalen Proteinen, bevor sie toxisch für die Zelle werden können. Besonders Stressbedingungen, wie Hitzeschock oder die Anwesenheit von Schwermetallen, führen zu einer erhöhten Expression von Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems (Seufert et al. 1990; Jungmann et al. 1993). Falsch gefaltete Proteine des endoplasmatischen Reticulums werden durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut, bekannt als ERAD-Weg (ER associated protein degradation) (Jarosch et al. 2003). Auch luminale, falsch gefaltete Proteine des ER, werden nach Translokation in das Cytosol durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut (Hiller et al. 1996). Die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen im Lumen des ER löst eine Signaltransduktionskaskade aus, bekannt als UPR (unfolded protein response), die unter anderem zu einer Induktion der Expression von Genen des Ubiquitin/Proteasom-Systems führt (Travers et al. 2000).

Die zweite zentrale Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Systems ist die Regulation des Zellzyklus. Die Schlüsselenzyme des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Kinasen. Die Konzentration der Cycline in den verschiedenen

Einleitung

Zellzyklus-Stadien wird sowohl durch transkriptionale Regulation als auch durch den Abbau der Cycline durch das Ubiquitin/Proteasom-System reguliert (Reed 2003).

Die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren werden durch Ubiquitin/Proteasom- vermittelte Proteolyse reguliert. Dazu zählen die Hefe-Proteine GCN4 und MET4 und in höheren Eukayonten c-Jun, E2F-1, c-Myc und c-Fos, als auch der der Tumorsuppressor p53.

Ein bekanntes Substrat für das Ubiquitin/Proteasom-System in der Signaltransduktion sind NF- κ B-Transkriptionsfaktoren. In Hefe wurden die NF- κ B verwandten Transkriptionsfaktoren SPT23 und MGA2 als Substrate der Ubiquitin-Proteasom-Maschinerie identifiziert. SPT23 und MGA2 lokalisieren in der ER-Membran als Dimer. Durch die Einwirkung des Ubiquitin/Proteasom-Systems wird ein Protein des Dimers verkürzt, es entsteht die so genannte p90-Form des Volllängen-Transkriptionsfaktors (p120) SPT23, die zunächst noch an das Volllängen SPT23 gebunden ist (Hoppe et al. 2000). Durch die Kooperation mit CDC48 wird die auf diese Weise aktivierte p90-Form in den Zellkern transportiert, wo es seine Aktivität als Transkriptionsfaktor entfaltet (Rape et al. 2001).

3. Neue „nicht-klassische“ Funktionen des Ubiquitin-Systems regulieren Lokalisation und Aktivität der Substratproteine

3.1 Funktion von Ubiquitin in der Endozytose

Ubiquitin bestimmt die Translokalisierung von vielen Plasmamembran Proteinen in endozytotische Vesikel und in das multivesikuläre Teilchen (*multivesicular bodies*; MVB).

Die Aktivität von Proteinen die an der Zelloberfläche wirken (Rezeptoren für Signaltransduktion, Transporter und Ionenkanäle) unterliegen einer strengen Regulation. Durch Endozytose können diese rasch von der Plasmamembran entfernt werden, und so Ihre Aktivität reduzieren. Endozytierte Proteine werden weiter zu Lysosomen (Hefe: Vakuole) transportiert, wo sie durch lysosomale Proteasen abgebaut werden.

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde der ABC-Transporter STE6 als erstes Substrat für Ubiquitylierung identifiziert, das in Endozytose-Mutanten in der Plasmamembran akkumuliert (Kölling et al. 1994). Später wurde entdeckt, dass die Ubiquitylierung für die Halbwertszeit des Proteins entscheidend war, und der Transport von der Plasmamembran in die endozytotischen Vesikel inhibiert war (Kölling et al. 1997).

Anhand des G-Protein Rezeptors STE2 wurde die Rolle von Ubiquitin als Transportfaktor in der Rezeptor-vermittelten Endozytose analysiert. STE2 wird durch Bindung an ein Peptidhormon (α -Faktor) aktiviert (Odorizzi et al. 1998). STE2 stimuliert, ähnlich wie EGF in höheren Eukaryonten, eine MAPK Kinase (MAPKK)-Kaskade, und wird durch Internalisierung an der Plasmamembran und Abbau in der Vakuole reguliert. Wenn alle Lysine auf der zytoplasmatischen Seite von STE2 durch Arginin ersetzt sind, kann das Protein nicht mehr internalisiert werden (Terrell et al. 1998). Im Gegensatz dazu wird ein Ubiquitin-STE2 Fusionsprotein, ähnlich wie das Wildtyp-Protein, rasch endozytiert und in der Vakuole abgebaut (Shih et al. 2000). Im Fall von STE2 hat Ubiquitin eine klare Funktion hinsichtlich früher Internalisierung an der Plasmamembran.

Im Fall von STE6 und FUR4 führt ein Defekt der Ubiquitylierung zu einer Akkumulation in einem prävakuolären Kompartiment, was ein Hinweis darauf war, dass die Ubiquitylierung auch zu einem späteren Zeitpunkt wichtig war (Dupre et al. 2001; Losko et al. 2001). GAP1, eine Aminosäurenpermease, kann unter bestimmten Bedingungen ubiquitinabhängig vom *trans*-Golgi-Netzwerk auf direktem Weg in die *multivesicular bodies* sortiert werden ohne jemals an die Plasmamembran zu gelangen (Helliwell et al. 2001). Dies zeigte, dass auch für den internen Transport in Vesikeln Ubiquitin maßgeblich war.

Einleitung

	Funktion	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Zell-Oberflächen Transmembran-Rezeptoren</i> STE2 STE3	α -Faktor Rezeptor α -FaktorRezeptor	Hicke et al. 1996 Roth et al. 1996; Chen et al. 2002
<i>Zell-Oberflächen Transmembran-Proteine</i> FUR4 GAP1 PDR5 STE6 TAT2 ZRT1 MAL61 GAL2 STS1	Uracil-Permease Aminosäuren-Permease „Multidrug“- Transporter ABC Peptid-Transporter Tryptophan-Permease Zink-Transporter Maltose-Permease Galaktose-Permease „Multidrug“- Transporter	Galan et al. 1996 Springael et al. 1998 Egner et al. 1996 Kölling et al. 1994 Beck et al. 1999 Gitan et al. 2003 Medintz et al. 1998 Horak et al. 1997 Egner et al. 1996
<i>Metabolische Transmembran-Proteine</i> CPS1 PHM5 SNA3	Vacuolen-Hydrolase Phosphat-Metabolismus unbekannt	Odorizzi et al. 1998 Reggiori et al. 2001 Reggiori et al. 2001
<i>Mammalia</i>		
<i>Zell-Oberflächen Transmembran-Rezeptoren</i> EGF-Rezeptor GHR IL-2 β β -AR T-Zell-Rezeptor α -Untereinheit PDGF-Rezeptor Fc β RI- Rezeptor c- Kit- Rezeptor FGF- Rezeptor CSF1- Rezeptor Met Tyrosine Kinase Rezeptor	Rezeptor-Tyrosin-Kinase Rezeptor-Tyrosin-Kinase Rezeptor-Tyrosin-Kinase Epinephrin G-Protein	Felder et al. 1990 Strous et al. 1996 Rocca et al. 2001 Shenoy et al. 2001 Cenciarelli et al. 1992 Mori et al. 1992 Paolini und Kinet 1993 Miyazawa et al. 1994; Yee et al. 1994 Mori et al. 1995 Mori et al. 1992 Jeffers et al. 1997
<i>Zell-Oberflächen Transmembran-Proteine</i> E-Cadherin EnaC MHCII	Zell-Zell Kontakt Na-Kanal Antigen-Präsentation	Staub et al. 1997; Fujita et al. 2002 Kleijmeer et al. 2001
<i>Metabolische TM-Proteine</i> LAP	Lysosomale Phosphatase	Di Guglielmo et al. 1994
<i>Virale Proteine</i> HIV-1Gag, MuLVGag, RSV	Virale Strukturproteine	Ott et al. 2000; Strack et al. 2000

Tabelle 2: bekannte Transmembranproteine die durch Ubiquitylierung reguliert werden können (Auswahl nach Hicke et al. 2003).

Eine große Anzahl von Plasmamembran-Proteinen, die ubiquityliert werden, sind heute bekannt (Tabelle 2). Die Ubiquitylierung des zytoplasmatisch gelegenen Teils der Membranproteine, die oft durch Phosphorylierung reguliert wird, erfolgt in Hefe in vielen Fällen durch die Ubiquitin-Ligase RSP5. Nedd4 ist das menschliche Homologe zu RSP5, und für die Ubiquitylierung von mehreren Kanalproteinen notwendig (Rotin et al. 2000). Dabei scheint Mono-Ubiquitylierung für die Internalisierung an der Plasmamembran ausreichend zu sein (Shih et al. 2000). Allerdings wurden auch kurze Ubiquitinketten, bestehend aus zwei Ubiquitinen, beschrieben, die über Lysin-63 des ersten Ubiquitins verknüpft sind und für die Endozytose bestimmter Membranproteine notwendig sind (Galan et al. 1997). Es wird angenommen, dass die Oberfläche des Ubiquitins von einem spezifischen Rezeptor erkannt wird. Interessanterweise wurden mehrere Proteine die am

Internalisierungs-Weg der Endozytose beteiligt sind, identifiziert, die ein Ubiquitin-interagierendes Motiv enthalten (UBA und oder UIM) und damit als Ubiquitin-Rezeptoren in Frage kommen (Hofmann et al. 2001). Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist Epsin (Hicke et al. 1996; Polo et al. 2002). Epsin enthält eine N-terminale ENTH Phospholipid Binde-Domäne, zwei UIM-Domänen und ein Clathrin/AP-2 Interaktions-Motiv. Substraterkennung der ubiquitylierten Cargoproteine erfolgt durch die UIMs (Hofmann et al. 2001; Shih et al. 2002). Durch das Clathrin-Bindemotiv könnte Clathrin rekrutiert werden und auf diese Weise die Verpackung des Cargos in endozytotische Vesikel erfolgen.

VPS27 und das Säuger-Homologe Hrs sind ebenfalls Proteine, die Ubiquitin Bindeeigenschaften besitzen (siehe Tabelle 1). Beide besitzen zwei Kopien der UIM-Domäne und binden in Abhängigkeit von diesen Domänen an Ubiquitin (Shenoy et al. 2001; Shih et al. 2002). Die Bindung an Ubiquitin kann durch Punktmutationen in den beiden UIM-Domänen reduziert werden, und führen dazu, dass CPS und STE2 nicht mehr korrekt sortiert werden können (Bilodeau et al. 2002). VPS27/Hrs bildet einen Komplex mit HSE1/STAM. HSE1/STAM enthält ebenso eine UIM-Domäne. In manchen Hefe-Stämmen führt eine Mutation in den UIM-Domänen von VPS27 und HSE1 zu Sortierungsdefekten (Bilodeau et al. 2002). Epsine können als Adaptoren definiert werden, die synchron das ubiquitylierte Cargo und Clathrin binden können und auf diese Weise das Cargo dem endozytotischen Vesikel Transport zuführen können (Polo et al. 2002).

Neben der Funktion der Sortierung von Substraten, wird noch eine weitere Funktion der UIMs diskutiert: UIMs von VPS27/HRS können dazu verwendet werden um Ubiquitin-modifizierte Komponenten der endosomalen Maschinerie zu erkennen. Hrs lokalisiert an Regionen von Clathrin (Raiborg et al. 2001; Sachse et al. 2001) und wird selbst ubiquityliert, genauso wie EPS15, ein Protein das während der Internalisierung an der Plasmamembran wirkt (van Delft et al. 1997; Polo et al. 2002). Die UIM-Domäne von EPS15 wiederum scheint direkt mit einem Ubiquitin Ligase-Komplex zu interagieren (Polo et al. 2002). Zusätzlich dient das konjugierte Monoubiquitin von EPS15 als Signal, das von Epsinen erkannt wird. CIN 85 und Numb sind zwei weitere endozytotische Proteine, die mono- und multiubiquityliert werden (Haglund et al. 2002; Nie et al. 2002).

3.2 Funktion von Ubiquitin im Vesikeltransport

Ein Beispiel für die ubiquitinabhängige Sortierung/Lokalisierung in die *multivesicular bodies* (MVBs) ist Carboxypeptidase S (CPS). Als *multivesicular bodies* wird ein vakuoläres Kompartiment bezeichnet, das durch Invagination von endozytotischen Vesikeln entsteht. CPS ist ein Transmembranprotein das von Golgi über Endosomen direkt in MVBs sortiert wird. Die Mutagenese des Lysin-8 durch Arginin, verhindert die Ubiquitylierung von CPS und die Lokalisierung in MVBs. Stattdessen erfolgt die Lokalisation in die vakuoläre Membran. Die Ubiquitin-Modifikation von CPS dient als Signal für den Transport in MVBs. Eine 7-Aminosäuren lange Peptidsequenz um das Lysin-8 reicht aus, um ursprünglich MVB-fremde Proteine zu ubiquitylieren und in den MVB zu lokalisieren

(Katzmann et al. 2001). Eine Leserahmenfusion mit Ubiquitin ist ausreichend um die Proteine in die MVBs zu lokalisieren (Urbanowski et al. 2001). Wenn die Ubiquitin Ligase TUL1 fehlt, führt dies zu einer Verminderung der Sortierung von CPS in die MVBs (Reggiori et al. 2002). Besonders interessant ist der Phänotyp in *doa4*-Mutanten. Diese Zellen besitzen eine reduzierte Menge an freiem Ubiquitin (Swaminathan et al. 1999). DOA4 ist für das Abschneiden von Ubiquitin von den Substraten, die für die Vakuole bestimmt sind, verantwortlich (Amerik et al. 2000). Wenn DOA4 fehlt, wird Ubiquitin zusammen mit den Substraten in das Lumen der Vakuole aufgenommen und durch vakuoläre Proteasen verdaut.

Mehr als 50 verschiedene Proteine sind am Proteintransport zur Vakuole beteiligt und werden als VPS (vacuolar protein sorting) Proteine bezeichnet. Je nachdem wo diese benötigt werden, sind die VPS Proteine klassifiziert in Klasse A - Klasse E (Conibear et al. 1998). Die Deletion eines der 17 VPS-Gene der Klasse E führt zur Akkumulation eines späten Endosoms, das als Klasse E-Kompartiment bezeichnet wird (Rieder et al. 1996). Im Klasse E-Kompartiment akkumulieren unter anderem Proteine, die für die Vakuole bestimmt sind. Plasmamembran-Proteine, die über den Endozytose-Weg transportiert werden, können ebenfalls im Klasse E-Kompartiment akkumulieren (Davis et al. 1993; Vida et al. 1995). Daraus schließt man, dass die biosynthetischen und endozytischen Wege zur Vakuole in einem gemeinsamen Kompartiment dem „prävakulären Kompartiment“, die als *multivesicular bodies* (MVBs) in Erscheinung treten, zusammenlaufen.

Für die Sortierung von Proteinen in multivesikuläre Teilchen sind mehrere Ubiquitin-Bindeproteine notwendig: VPS23 ist ein Klasse E-Protein, und besitzt eine spezielle Variante einer Ubiquitin-konjugierenden Domäne (UEV, siehe Tabelle 1) (Babst et al. 2000; Katzmann et al. 2001). *In vitro* bindet auch das Säuger- Homologe von VPS 23, Tsg101, an Ubiquitin (Pornillos et al. 2002). VPS23 bildet zusammen mit VPS28 und VPS37 einen 350 kDa großen Komplex, der als ESCRT-I (endosomal sorting complex required for transport-I) bezeichnet wird. Die UEV-Domäne wird benötigt um monoubiquityliertes CPS zu erkennen und zu sortieren. Auch TSG101 ist Bestandteil eines 350 kDa großen Komplexes. In Maus-Fibroblasten führt die funktionelle Inaktivierung von TSG101 zu einer Verstärkung des Recyclings des EGF-Rezeptors (Babst et al. 2000). Die verstärkte Präsentation des Rezeptors führt zu einer Zunahme des EGF-stimulierten Signals an der Plasmamembran.

3.3 Funktion von Ubiquitin in der DNA-Reparatur

Die ersten Hinweise, dass Ubiquitin eine wichtige Funktion im Zellkern erfüllt, kam durch die Entdeckung, dass Histone ubiquityliert werden (West et al. 1980; Busch et al. 1981).

RAD6/UBC2 wurde als das Ubiquitin-konjugierende E2 für die Ubiquitylierung von Histon H2B identifiziert (Jentsch et al. 1987; Robzyk et al. 2000). Von besonderer Bedeutung ist, dass RAD6 zugleich die zentrale Komponente des postreplikativen DNA-Reparatur-Wegs darstellt

(Lawrence 1994). Zwei weitere E2 Proteine, UBC13 und MMS2, wurden identifiziert, die als Heterodimer ein aktives Ubiquitin-konjugierendes Enzym bilden, und die Bildung von Lysin-63 verknüpften Multiubiquitinketten katalysieren (Hofmann et al. 1999). RAD6 und UBC13-MMS2 können durch die Interaktion mit den RING-Finger enthaltenden DNA-Bindeproteinen RAD18 und RAD5 an das Chromatin rekrutiert werden (Ulrich und Jentsch 2000). Zuletzt konnte PCNA als erstes Substrat für die Chromatin assoziierte Ubiquitin-Konjugationsmaschinerie identifiziert werden (Hoege et al. 2002). PCNA bildet einen trimeren Ring am Chromatin, wo es als Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerasen wirkt (Tsurimoto 1999; Warbrick 2000). PCNA ist ein essentieller Faktor für die Replikation, die Replikations-abhängige DNA-Reparatur und Silencing (Bauer et al. 1990). Für die Ubiquitylierung von PCNA wird RAD6 und RAD18 benötigt, die die Verküpfung des ersten Ubiquitin katalysiert. UBC13-MMS2 zusammen mit RAD5 verlängert das monoubiquitylierte PCNA durch das Anknüpfen einer K63-verknüpfte Ubiquitinkette. Als dritte Modifikations-Variation von PCNA dient die SUMOylierung (Hoege et al. 2002). SUMO ist ein Ubiquitin ähnliches Protein. Die drei Modifikations Möglichkeiten dienen für sich als Signale, um die feinabgestimmte Inhibierung und Aktivierung der Replikations-abhängigen DNA-Reparatur zu gewährleisten (Hoege et al. 2002; Stelter et al. 2003).

4. Ubiquitin und Fusion von Membranen

Die intrazelluläre Fusion von Membranen ist ein konservierter Prozess der vom Menschen bis zur Hefe gleich abläuft. Die Membranfusion kann in drei definierte biochemische Reaktionen unterteilt werden. In der ersten Reaktion findet eine Früherkennung zwischen Donor- und Akzeptor-Membran statt. Hier spielen YPT/Rab GTPasen und sogenannte „tethering“- Faktoren eine wichtige Rolle. In weiterer Folge wird ein näherer Kontakt zwischen den Membranen aufgebaut. Dieser „docking“-Vorgang wird durch sogenannte SNAREs vermittelt. SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) sind kleine Coiled-Coil Domänen enthaltende membrangebundene Proteine. Ein Vesikelmembran-gebundenes SNARE (v-SNARE) bildet zusammen mit einem Zielmembran-gebundenen SNARE (t-SNARE) (Rothman 1994) ein Bündel von vier parallelen α -Helices (Sutton et al. 1998). Die dritte Stufe ist die Fusion der Vesikelmembran mit der Zielmembran. Es wird angenommen, dass die Assemblierung des vier-Helix Bündels die notwendige freie Energie liefert, um die einander gegenüberstehenden Membranen nah genug zueinander zu bringen, damit diese fusionieren können (Hanson et al. 1997; Weber et al. 1998; Chen et al. 2001).

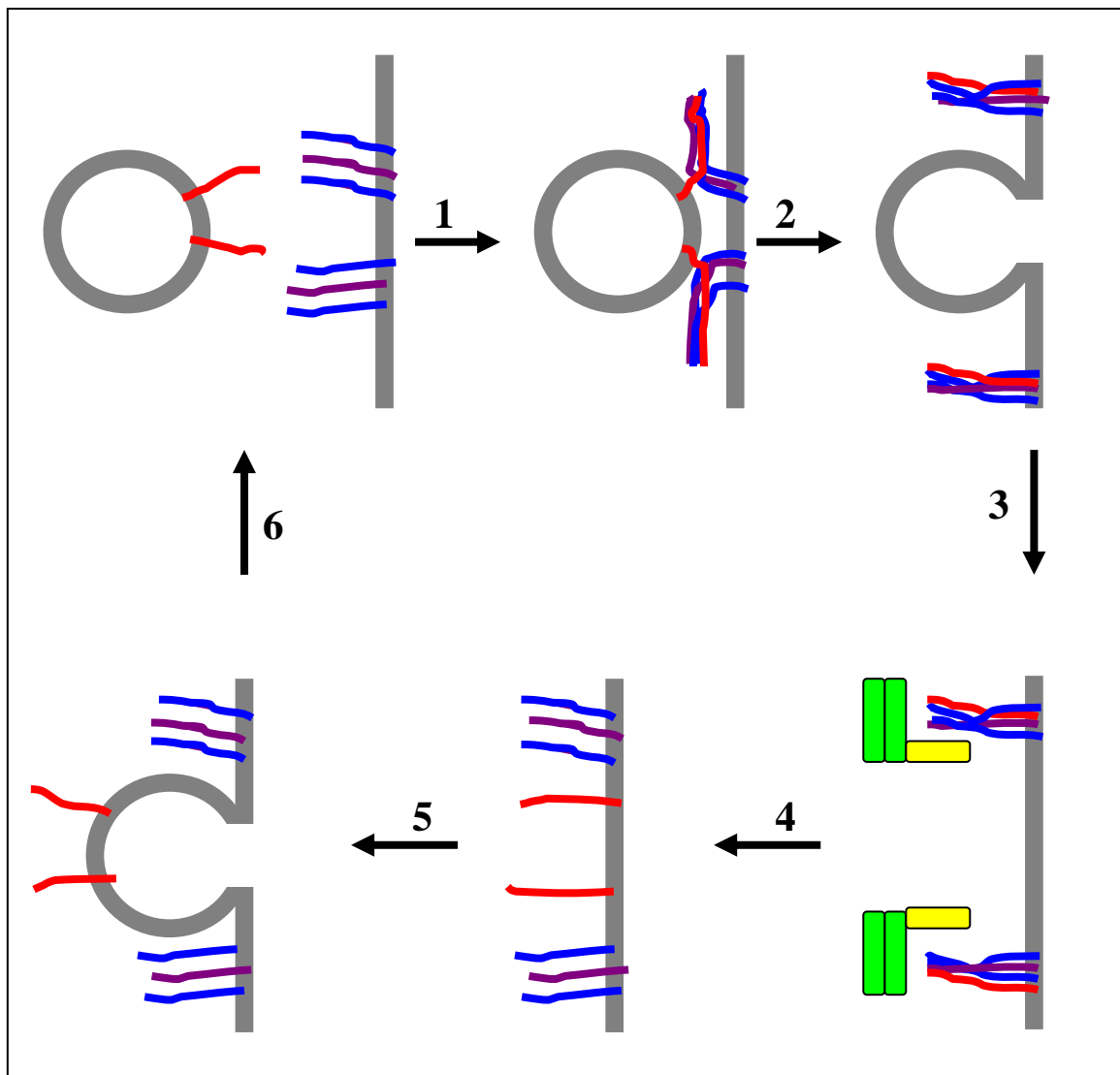


Abbildung 1-3: Modell der SNARE-vermittelten Membranfusion: 1. Formierung des *trans*-SNARE Komplexes 2. Vesikelfusion 3. Bindung von NSF und α -SNAP 4. ATP-getriebene SNARE Komplex Dissoziation 5. v-SNARE Recycling 6. Vesikel Abschnürung. λ v-SNARE, λ t-SNARE; SNAP-25 an der Plasmamembran λ t-SNARE, λ NSF (SEC18), λ α -SNAP (SEC17).

Die Bildung des *trans*-SNARE Komplexes führt zur Membranfusion und der Akkumulation eines *cis*-SNARE Komplexes in der Akzeptor-Membran. Um SNAREs für weitere Runden der Membranfusion wieder bereit zu stellen („priming“) ist eine Disassemblierung des *cis*-SNARE Komplexes erforderlich (Abbildung 1-3). Dieser Prozess wird durch eine AAA-ATPase katalysiert, den N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF; SEC18 in Hefe), und das lösliche NSF Bindeprotein α -SNAP (SNAP-soluble NSF attachment protein). Dieser Prozess ist ATP abhängig. NSF wurde als essentielle Komponente für den intra-Golgi Transport von Vesikeln identifiziert (Block et al. 1988). Inzwischen weiß man, dass NSF sowohl für den Vesikel-Transport vom ER zum Golgi (Beckers et al. 1989) und in der Endozytose in Hefe (Diaz et al. 1989) als auch im Vesikel-Transport vom ER zum Golgi in Säugern (Wilson et al. 1989) benötigt wird.

Interessant ist eine Mutante von NSF in *Drosophila* (dNSF-1), die keine ATPase-Aktivität mehr besitzt. Unter restriktiven Temperatur-Bedingungen akkumulieren synaptische Vesikel, in denen sich stabile v-SNARE/t-SNARE Komplexe befinden. NSF befindet sich nicht in den SNARE Komplexen. Unter permissiven Bedingungen bindet dNSF-1 an die SNARE Komplexe, diese können aber nicht disassembliert werden (Müller et al. 1999). Diese Beobachtungen zeigen, dass neben der ATPase abhängigen Funktion der SNARE-Disassemblierung von NSF noch eine zweite ATPase unabhängige NSF Funktion besteht.

Neben den Hauptproteinen, die für die Fusion benötigt werden (v-SNARE, t-SNARE, NSF und α -SNAP), wurden akzessorische und regulatorische Proteine identifiziert. Besonders interessant ist GATE-16 („Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa“), das an SNAREs binden kann. Es wird vermutet, dass GATE-16 für das „Getrennthalten“ von SNAREs nach der Disassemblierung der *cis*-SNARE Komplexe verantwortlich ist (Elazar et al. 2003). GATE-16 besitzt eine ubiquitinähnliche Domäne (Klionsky et al. 1999), und ist essentiell für den NSF-getriebenen Golgi-Zusammenbau (Sagiv et al. 2000; Müller et al. 2002). Dabei katalysiert NSF/ α -SNAP eine ATP-unabhängige Bindung von GATE-16 an das Golgi v-SNARE, GOS-28. Gleichzeitig wird durch die GATE-16-GOS28 Komplexbildung die Bindung des v-SNARE, GOS-28, an seinen t-SNARE-Partner, Syntaxin-5, verhindert (Müller et al. 2002). Aus diesen Beobachtungen können zwei Aktivitäten für NSF beschrieben werden, eine entfaltende und eine faltende Aktivität. Die ATPase abhängige entfaltende Aktivität von NSF vermittelt die *cis*-SNARE-Disassemblierung. Die ATPase unabhängige faltende Aktivität vermittelt die Komplexbildung zwischen GATE-16 und GOS-28.

Aus Frosch-Oocyten wurde p97 als ein Homologes von NSF isoliert (Peters et al. 1990). Dieses Protein besitzt eine spezifische Funktion für die Membranfusion der äußeren Kernhüllenmembran während der Karyogamie in Hefe (Latterich et al. 1995). In höheren Eukaryonten, wird p97 mit der post-mitotischen Fusion von Golgi-Membranen und ER verantwortlich gemacht (Kondo et al. 1997; Roy et al. 2000).

Für den Zusammenbau der Kernhülle ist die Bildung des Komplexes von p97 mit dem heterodimeren Co-Faktor UFD1/NPL4 essentiell (Hetzer et al. 2001). Im Gegensatz dazu, erfordert das Wachstum der Kernhülle die Komplexbildung von p97 mit dem Adaptor p47 (Hetzer et al. 2001). Die Funktion von p47 ist die Vermittlung der Interaktion von p97 mit dem t-SNARE Syntaxin 5 (Rabouille et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der p47/p97 Komplex und der p97/UFD1/Npl4 Komplex exklusiv sind (Meyer et al. 2002).

Die Funktion von p97 wurde besonders gut mit Hilfe des Hefe Homologen CDC48 beschrieben. Die katalytisch inaktive Mutante von CDC48 wurde aus Zellen isoliert, in denen das kurzlebige Modells substrat Ubiquitin-Fusionsprotein stabilisiert war (Johnson et al. 1995; Ghislain et al. 1996). Ähnlich wie für p97 beschrieben, ist CDC48 Teil von mehreren verschiedenen Komplexen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Zusammen mit dem Adaptor SHP1 (p47 in höheren Eukaryonten) ist CDC48 für die homotypische ER-Membranfusion essentiell (Latterich et al. 1995). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass SHP1 an Ubiquitin binden kann (Schubert et al. 2004).

Im Komplex mit dem heterodimeren UFD1/NPL4 Kofaktor hingegen, besitzt CDC48 wichtige Funktion für den ER-assoziierten Abbau, den ERAD-Weg (Bays et al. 2001; Ye et al. 2001; Braun et al. 2002; Jarosch et al. 2002; Rabinovich et al. 2002; Ye et al. 2003), für die Aktivierung des ER-gebundenen Transkriptionsfaktors SPT23 (Rape et al. 2001), und für die Spindel-Disassemblierung (Cao et al. 2003). Das E4 Protein UFD2 bindet an Ubiquitin-Konjugate und an CDC48, und katalysiert die Ubiquitin-Kettenverlängerung von oligoubiquitylierten Substraten (Koegl et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex CDC48/UFD1/NPL4, der bevorzugt ubiquitylierte Substrate bindet (Rape et al. 2001), ein wichtiger Faktor für die Erkennung von oligoubiquitylierten Substraten ist. Durch die Weiterleitung an den Multiubiquitylierungs-Faktor UFD2, werden die Substrate multiubiquityliert, von den proteasomal assoziierten Erkennungsproteinen RAD23 und DSK2 erkannt, und durch das Proteasom abgebaut (Richly et al. 2004). CDC48 wurde auch im Komplex mit UBX-Proteinen gefunden (Schubert et al. 2004).

Die AAA-ATPase VPS4 ist am endozytotischen Vesikeltransport in die MVBs beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass VPS4 für den Recycling Prozess der ESCRT-Komplexe (ESCRT-I, -II und III) benötigt wird. ESCRT-I aktiviert einen weiteren peripheren Membran-Komplex, ESCRT-II (Babst et al. 2002a). Ein dritter Komplex ESCRT-III ist aus vier Coiled-Coil-Domänen enthaltenden Proteinen aufgebaut, die für die Bildung der internen Vesikel in die MVBs verantwortlich sind (Babst et al. 2002b). Wie bei SNAREs nimmt man an, dass die ESCRT-III Komponenten für mehrer Runden der MVB-Bildung zur Verfügung stehen. In *vps4* Zellen akkumulieren die MVB-Substrate im Klasse E-Kompartiment (Babst et al. 1998). Die Komponenten VPS2-VPS24 binden ATP-gebundenes VPS4 an den ESCRT-III Komplex (Babst et al. 2002b). Die *vps4^{ts}* Mutante die kein ATP binden kann, verbleibt im Zytosol (Babst et al. 1998). Es wird angenommen, dass Ubiquitin den geordneten Ablauf der Bindung der Komplexe organisiert, um geeignete Substrate für VPS4 zur Verfügung zu stellen. Es ist möglich, dass ESCRT-II oder andere Ubiquitin-Bindeproteine als Adaptoren für VPS4 wirken, um seine eigene Rekrutierung zu verstärken.

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten Komponenten der Membranfusions-Maschinerie auf ihre Regulation durch Ubiquitin-Modifikation untersucht werden. Dazu wurden die an der Plasmamembran wirkenden homologen v-SNAREs SNC1 und SNC2 ausgewählt, die durch die bekannte genetische und physikalische Interaktion mit dem Ubiquitin-Bindeprotein DDI1 besonders interessant erschienen. Es sollte untersucht werden, ob die SNAREs SNC1 und SNC2 ubiquityliert werden, und welcher Natur die Ubiquitylierung war. Zusätzlich sollten die Enzyme, die die Ubiquitylierung katalysieren, identifiziert werden. Von besonders großem Interesse war die Funktion der SNARE-Ubiquitylierung. Dazu sollte die Stabilität des ubiquitylierten Proteins untersucht werden, um einen Hinweis zu bekommen, ob die Ubiquitylierung zum Abbau durch das Proteasom führt. Parallel dazu sollte untersucht werden, wo in der Zelle die Ubiquitylierung stattfindet. Da bekannt war, dass Plasmamembran-Proteine abhängig von ihrer Ubiquitylierung in die Vakuole sortiert werden, sollte der Einfluß der Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 auf deren Lokalisierung beziehungsweise Sortierung in der Endozytose untersucht werden.

Zusätzlich sollte die Funktion der bereits bekannten physikalischen und genetischen Interaktion von SNC1 und SNC2 mit DDI1 näher untersucht werden. Dazu wurde die Bindung der DDI1-internen UBA-Domäne mit Ubiquitin getestet.

Ergebnisse

1. Die Charakterisierung der Ubiquitylierung der v-SNAREs SNC1/SNC2

1.1 SNC1 und SNC2 besitzen sechs konservierte Lysin-Reste

Die Entdeckung, dass das t-SNARE UFE1 in *pkc1-2*, eine temperatursensitive Mutante der Serin/Threonin Proteinkinase C, kurzlebig wurde, war ein erster Hinweis darauf, dass SNAREs mit dem Ubiquitin/Proteasom-System möglicherweise interagieren. Der beobachtete Phänotyp konnte mit dem zusätzlichen Ausschalten des E2 UBC7 gerettet werden (Lin et al. 2001). Die zweite interessante Beobachtung war, dass *pkc1-2* Zellen, wenn diese restriktiven Temperaturbedingungen ausgesetzt wurden, keine ER-Fusion mehr stattfinden konnte (ER-Membran-Fusions-assay). Die Proteinmenge von CDC48 und UFE1 war stark reduziert. Lin und Kollegen glauben, dass durch den Verlust der Aktivität der Serin/Threonin Proteinkinase-C UFE1 am Endoplasmatischen Reticulum proteasomabhängig abgebaut wird. Die vermutete Ubiquitylierung von UFE1, die den proteasomabhängigen Abbau bedingt, wurde jedoch nicht gezeigt.

Da bisher der Zusammenhang zwischen Ubiquitin und SNAREs nur indirekt gezeigt werden konnte, schien es lohnenswert, die Ubiquitin-Konjugierung von SNAREs selbst zu testen. Es wurden die SNC v-SNAREs ausgewählt, die den *trans*-SNARE Komplex an der Plasmamembran bilden (Gerst 1999), und durch die Interaktion mit dem Ubiquitin-Bindeprotein DDI1 besonders interessant erschienen (Lustgarten et al. 1999).

SNC1 und SNC2 sind zu 83% identisch. SNC1/SNC2 verfügen, wie die meisten SNAREs, über eine C-terminale Transmembran-Domäne zur Verankerung in die Membran und eine N-terminale amphipathische α -helikale Region (Aminosäuren 32-85; siehe Abbildung 2-1), die in H1- und H2-Helix unterteilt wird. Diese Region kann mit dem Partner-SNARE SSO1 einen Coiled-Coil bilden. SNC1/SNC2 besitzen eine hohe Identität mit den neuronalen Vamp 1 und Vamp 2 in höheren Eukaronten (siehe Diskussion, Abbildung 3-1). Die Doppelmutation *snc1 snc2* führt zu einem verlangsamten Wachstum bei 26°C und Temperatursensitivität bei über 35 °C (Gurunathan et al. 2000). *snc1 snc2* Zellen akkumulieren post-Golgi Vesikel (Protopopov et al. 1993). Obwohl Vamp 1 und Vamp 2 35 % identisch zu SNC1 und SNC2 sind, können sie den *snc1 snc2* Phänotyp nicht komplementieren. Ein Austausch der konservierten α -helikalen Region H2 (Aminosäuren 65-82) mit der analogen Region von Vamp 2 kann den *snc1 snc2* Phänotyp funktionell komplementieren (Gerst 1997).

Ergebnisse

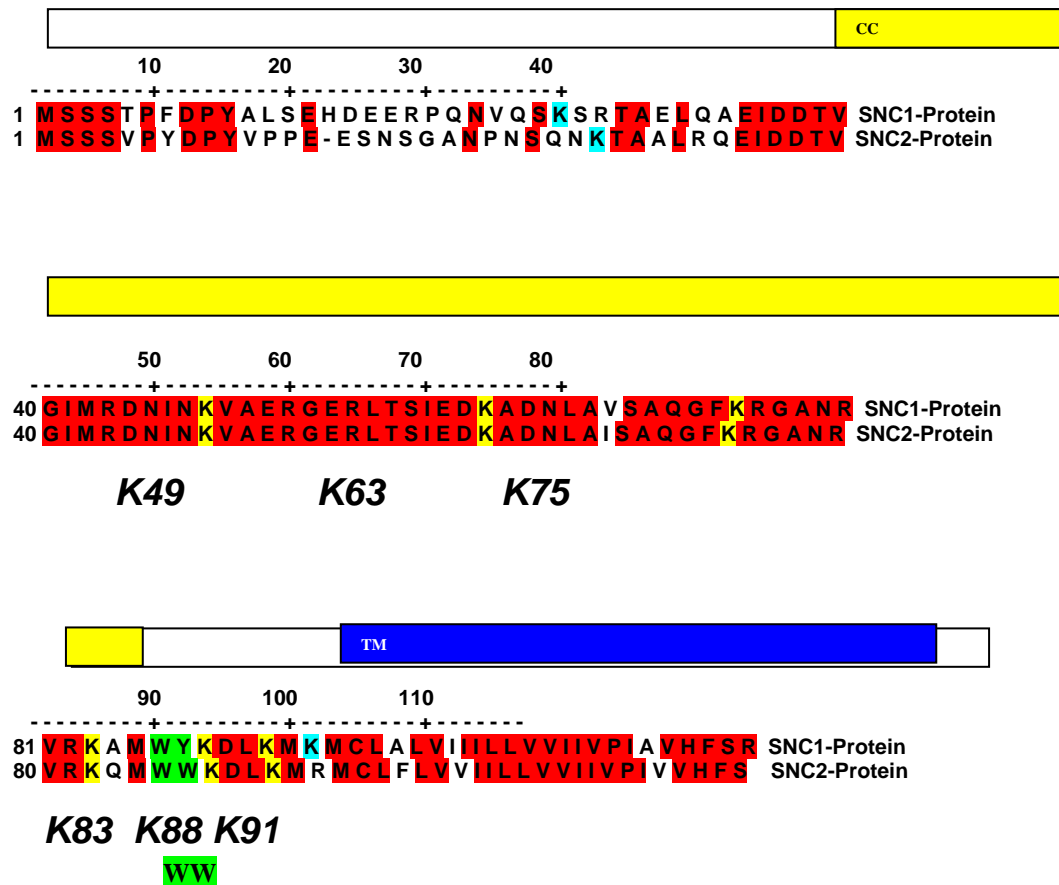


Abbildung 2-1: Protein-Sequenzvergleich von SNC1 und SNC2. SNC1 ist mit SNC2 zu 83% identisch (rot), und besitzt sechs konservierte Lysinreste (gelb). Die Struktur wird durch eine N-terminale Coiled-Coil Region (CC) und eine C-terminale Transmembran-Domäne (TM) dominiert.

SNC1 und/oder SNC2 sind Teil von zwei verschiedenen Komplexen: An der Plasmamembran bildet das SNAP-25 Homologe SEC9 und das t-SNARE SSO1 zusammen mit SNC1 oder SNC2 im endozytotischen Vesikel den sogenannten *trans*-SNARE Komplex (Rossi et al. 1997). Das vier-Helix-Bündel an der Plasmamembran besteht aus jeweils einer Helix vom v-SNARE und vom t-SNARE und zwei α -Helices von SNAP-25 (Fasshauer et al. 1998a). Die Interaktion des Bündels ist hydrophob, bis auf eine Stelle in der Mitte des Bündels, hier besteht eine Ionenbindung zwischen Argininresten und Glutaminresten. Diese Aminosäurenreste sind in allen SNAREs konserviert, und sind verantwortlich für die Klassifikation in Q-SNAREs und R-SNAREs (Fasshauer et al. 1998b). In diesem Komplex befindet sich zusätzlich das Chaperon NSF (SEC18 in Hefe) mit dem Chaperon-Aktivator α -SNAP (SEC17 in Hefe), die für die Fusion von Vesikel mit der Plasmamembran benötigt werden (Brennwald et al. 1994; Rossi et al. 1997).

Der zweite Komplex am späten Golgi ist ähnlich aufgebaut. In zellinternen SNARE-Komplexen wird das vier-Helix-Bündel durch drei α -Helices eines t-SNAREs und eine α -Helix eines v-SNAREs gebildet. Es wurden die Golgi-

Membran spezifischen t-SNAREs TLG1/TLG2 im selben Komplex mit SNC1/SNC2 gefunden (Lewis et al. 2002).

SNC1 wird durch Palmitoylierung (Couve et al. 1995) und Hyperphosphorylierung (Galan et al. 2001; Hettema et al. 2003) modifiziert. Inwieweit funktionell zwischen dem Einbau von SNC1 und dem Einbau von SNC2 in den *trans*-SNARE Komplex unterschieden wird, ist unbekannt. SNC1/SNC2 besitzen sechs konservierte Lysine, die für eine mögliche Ubiquitylierung in Betracht kommen (Abbildung 2-1).

1.2 N-terminal HA/Myc markiertes SNC1/SNC2 sind funktionell

Um SNC1/SNC2 im Western Blot detektieren zu können wurden die Promotoren und Leserahmen von SNC1 und SNC2 am 3'-Ende mit der Sequenz eines dreifachen HA- oder Myc-Epitops fusioniert (3HA, 3Myc), und in Expressionsvektoren kloniert. Dazu wurden chromosomal integrative (Yeast Integrative plasmid; YIp) als auch episomale Vektoren (Yeast Episomal plasmid; YEp) verwendet. Das Resultat war die Expression eines N-terminal markierten Proteins (3HA-SNC1, 3HA-SNC2 und 3Myc-SNC2).

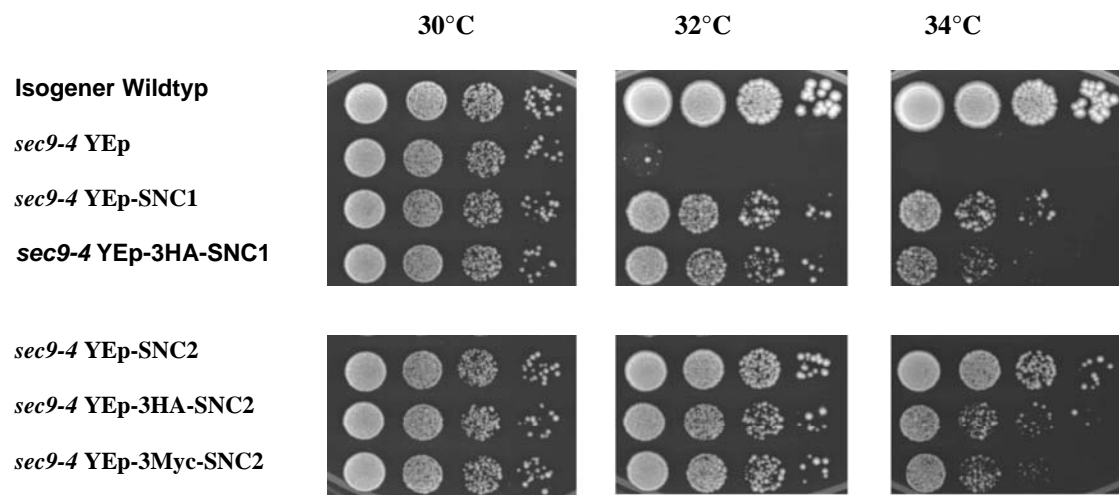


Abbildung 2-2: N-terminal Epitop-markiertes SNC1 und SNC2 sind funktionell. Das Wachstum (serielle Verdünnungsreihe) von wt Zellen und *sec9-4* Zellen, wenn leerer Vektor (YEp), unmarkiertes SNC1/SNC2 (YEp-SNC1, YEp-SNC2), und epitpomarkiertes SNC1/SNC2 (YEp-3HA-SNC1, YEp-3HA-SNC2; YEp-3Myc-SNC2) in den Zellen vorhanden sind, wurden miteinander verglichen.

Um physiologisch relevante Ergebnisse zu erhalten, sollte festgestellt werden, welche Auswirkung die N-terminale Epitop Markierung auf die Funktion von SNC1/SNC2 hatte. Es war bereits bekannt, dass das Wachstum von temperatursensitiven *snc1 snc2* Doppelmutanten durch die Plasmid-Expression von N-terminal Epitopmarkiertem HA-SNC1 gerettet werden kann

(Gerst 1997). Auch die Expression von YEp-Myc-SNC2 in *snc1 snc2* Doppelmutanten führte zur Rettung des temperatursensitiven Phänotyps von *snc1 snc2* Mutanten, im Vergleich mit *snc1 snc2* Zellen in denen der leere Vektor exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob das N-terminal markierte SNARE noch in den *trans*-SNARE Komplex integriert werden konnte, wurde die Rettung des Wachstums in *sec9-4* Zellen untersucht. Diese Methode wurde für die Funktions-Charakterisierung von epitopmarkierten SNC1 und SNC2 bevorzugt verwendet.

Die Rettung des temperatursensitive Phänotyps von *sec9-4* durch die Überexpression von SNC1 wurde zuvor schon gezeigt (Couve et al. 1994; Couve et al. 1995; Gerst 1997). Es wurden HA-und Myc-Epitop markiertes SNC1 und SNC2 mit Hilfe eines chromosomal integrierenden Vektors in den isogenen Wildtyp und in den *sec9-4* Stamm transformiert. Durch serielle Verdünnungsreihen wurde das Wachstum der Zellen überprüft.

Es zeigte sich, dass alle N-terminal markierten Versionen der SNAREs den temperatursensitiven Phänotyp in *sec9-4* Zellen retten konnten (Abbildung 2-2). Bei Vergleich der unmarkierten mit den Epitop-markierten Proteinen bei 32°C konnte eine minimale Wachstums-Benachteiligung der markierten Formen gegenüber der unmarkierten Form beobachtet werden. Bei 34° wurde dieser Effekt deutlicher erkennbar. Bei Vergleich des Wachstums mit dem isogenen Wildtyp, zeigt sich, dass die Rettung der Temperatursensitivität von *sec9-4* Zellen durch Überexpression von SNC1/SNC2 nicht vollständig ist, da der isogene Wildtyp im Vergleich deutlich schneller wuchs als der *sec9-4* Stamm. Insgesamt kann also festgestellt werden, dass die endogene Expression von N-terminal markierten SNC1/SNC2 die physiologische Situation in Wildtyp Zellen widerspiegelt.

1.3 SNC1/SNC2 wird mit Ubiquitin modifiziert

Schon erste vorhergehende Experimente zeigten, dass HA-SNC1 nicht als einzelne Bande im SDS-Page Gel gefunden wurde, sondern zusätzlich zur 21 kDa Bande eine 30 kDa große Bande identifiziert werden konnte. Ob diese Bande einer ubiquitylierten Spezies von SNC1 entsprach, wurde durch HA-Epitop-markiertes SNC1 und SNC2 in Zellen in denen Ubiquitin oder Myc-Ubiquitin exprimiert wurde, überprüft.

In diesen Experimenten konnte man, durch Vergleich der ubiquitylierten Spezies mit den Myc-ubiquitylierten Spezies, erkennen, dass SNC1 und SNC2 kovalent mit Ubiquitin beziehungsweise mit Myc-Ubiquitin verknüpft war. In Zellen, die HA-SNC1 oder HA-SNC2, das vom endogenen Promotor aus exprimiert wurden, war der Anteil der ubiquitylierten Form eher gering (Abbildung 2-3A; HA-SNC1 nicht gezeigt), wurde das SNARE in den Zellen überexprimiert (Abbildung 2-3B), so nahm nicht nur der Anteil des Proteins zu, sondern auch der Grad der Ubiquitylierung zu (Abbildung 2-3B; HA-SNC2 nicht gezeigt). Zwei Ubiquitin-Banden waren deutlich erkennbar; durch längere Exponierung des Blots konnten vier Banden identifiziert werden, die multiubiquityliertem SNC1 entsprachen. Die Unterscheidung, ob die Ubiquitylierung an verschiedenen Lysinen oder an einem Lysin als verlängerte Ubiquitin-Kette erfolgt, ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

Ergebnisse

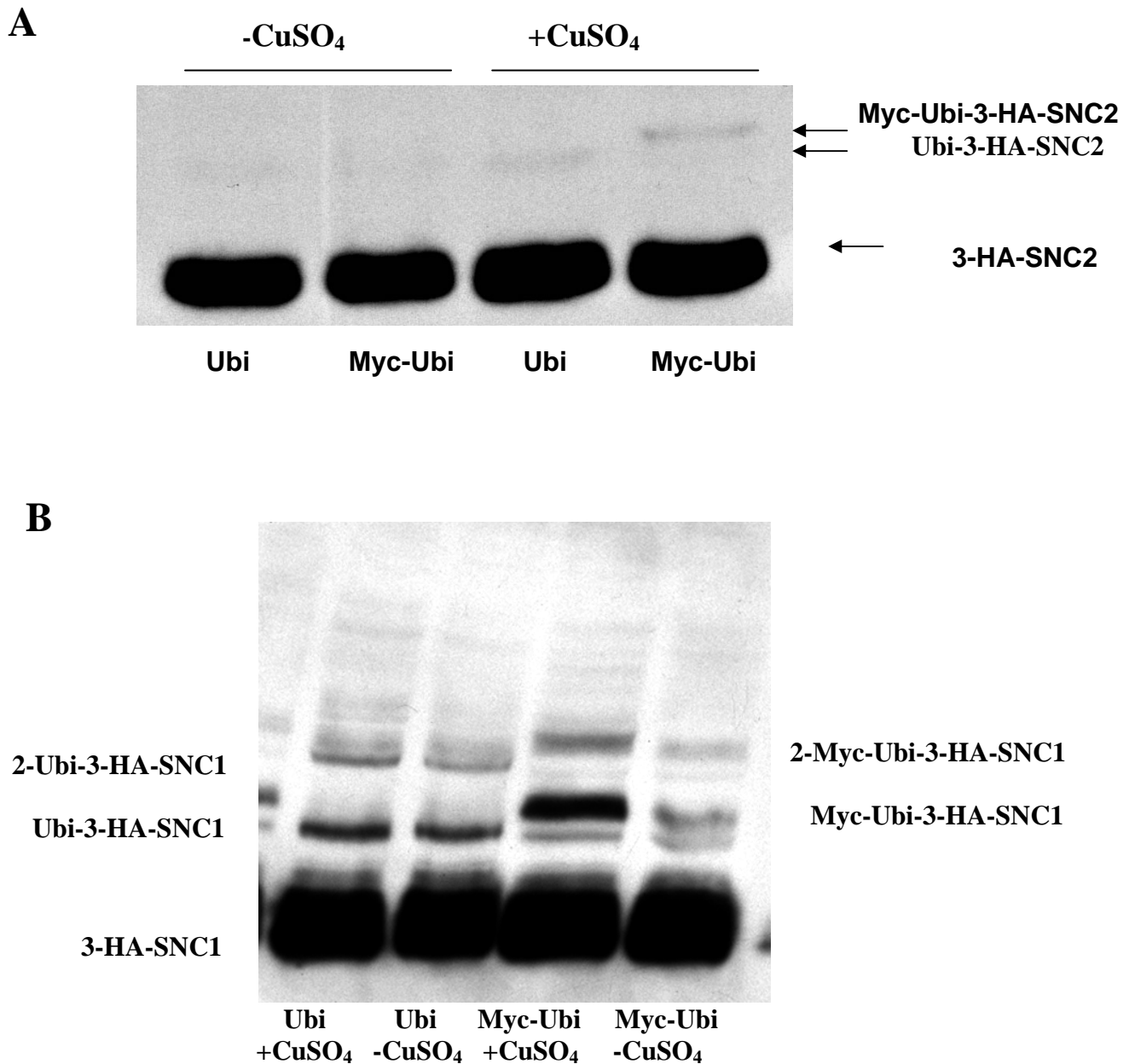


Abbildung 2-3: Die v-SNAREs SNC1 und SNC2 werden ubiquityliert. **A.** Vergleich der Expression (vom endogenen Promotor aus) von N-terminal 3HA-Epitop markiertem SNC2 mit gleichzeitiger Expression von mit CuSO₄ induzierbarem Ubiquitin (Ubi) und Myc-Ubiquitin (Myc-Ubi). Die unterschiedlichen Stämme wurden mit oder ohne Zugabe von CuSO₄ verglichen. **B.** Vergleich der Überexpression (Induktion durch Galaktose) von N-terminal 3HA-Epitop markiertem SNC1 mit gleichzeitiger Expression von mit CuSO₄ induzierbarem Ubiquitin (Ubi) und Myc-Ubiquitin (Myc-Ubi). Die Stämme wurden mit oder ohne Zugabe von CuSO₄ verglichen. Die Detektion erfolgte mit anti-HA-Antikörper.

1.4 SNC2 wird am Lysin-63 ubiquityliert

Zur Auffindung der für die Ubiquitin-Konjugation relevanten Lysine, wurde eine Punktmutagenese in SNC1 und SNC2 durchgeführt, dass zum Austausch eines Lysins durch Arginin führte. Es wurden die sechs Lysine berücksichtigt, die in SNC1 und SNC2 konserviert sind: Lysin-49, Lysin-63, Lysin-75, Lysin-83, Lysin-88 und Lysin-91. Die ersten drei Lysine befinden sich in der Coiled-Coil Region, die letzten drei Lysine im „Genick“ zwischen der Coiled-Coil Region und der C-terminalen Transmembran-Domäne.

Es wurden Stämme konstruiert, in denen jeweils ein, zwei, drei oder vier Lysine mutiert waren. Um die ubiquitylierten Banden von den Hintergrund Banden unterscheiden zu können, wurden jeweils Ubiquitin und Myc-Ubiquitin induziert und nebeneinander auf dem Gel aufgetragen.

Keine der Lysin-zu-Arginin Einzelmутanten von den oben angegebenen Lysinen führten zum vollständigen Verlust der monoubiquitylierten Spezies sowohl in SNC1 als auch in SNC2. In SNC2-K63R Mutanten, in denen das Lysin an der Stelle 63 durch Arginin ersetzt worden war, war die diubiquitylierte Spezies sowohl in Stämmen die HA-SNC2-K63R chromosomal unter endogener Promotorregulation exprimierten (Abbildung 2-4A), als auch in Stämmen die HA-SNC2-K63R durch einen Gal-Promotor überexprimierten (Abbildung 2-4B), deutlich reduziert. Die Reduktion der diubiquitylierten Spezies in den SNC2-K63R Mutanten, läßt den Schluß zu, dass das Lysin-63 eine wichtige Stelle für die Ubiquitylierung darstellt. Die marginal verbleibende Diubiquitylierung von HA-SNC2-K63R kann zwei Gründe haben: Erstens, K63R ist die einzige Ubiquitylierungsstelle; wenn K63R im Protein nicht verfügbar ist, dann kann eine alternative Lysin Stelle benutzt werden. Die verbleibende mono- und diubiquitylierte Spezies ist Resultat der Benutzung eines alternativen Lysins. Zweitens, eine zweite physiologisch relevante Ubiquitylierungsstelle wird ubiquityliert und steht mit der Lysin-63 Ubiquitylierung in Beziehung, das die reduzierte Monoubiquitylierung in K63R Mutanten erklärt.

Es wurde getestet, welches der verbleibenden Lysine für eine mögliche zweite Ubiquitylierungsstelle in Betracht kommen könnte. In HA-SNC2-K63R K88R Doppelmутanten und in HA-SNC2-K63R K83R K88R Tripelmутanten ist das Erscheinen der mono- und diubiquitylierten Spezies, wie in HA-SNC2 K63R Mutanten, stark reduziert (Abbildung 2-4B). Da der Verlust der Ubiquitylierung in den Doppel- und Tripelmутanten gegenüber der K63R-Einzelmутante nicht verstärkt ist, kann man daraus schließen, dass die Lysin-83 und Lysin-88 Stelle keinen Einfluß auf den Ubiquitylierungsgrad von SNC2 zu haben scheint. In HA-SNC1 exprimierenden Zellen war die mono- und diubiquitylierte Spezies von SNC1 sehr gering, schien jedoch in allen getesteten Einzelmутanten als auch in der HA-SNC1-K63R K88R Doppelmутanten und in der HA-SNC1-K63R K83R K88R Tripelmутanten vorhanden zu sein. Aufgrund der schwachen Detektion der diubiquitylierten Spezies von HA-SNC1 ist eine eindeutige Interpretation nicht möglich (Abbildung 2-4B). Der Vergleich der Tripelmутanten von HA-SNC2-K63R K83R K88R und HA-SNC1-K63R K83R K88R zeigt, dass beide Mutanten noch ubiquityliert werden. Die Lysin-zu-Arginin Mutagenese von K63R, K83R und K88R reicht nicht aus, um die Ubiquitylierung von SNC1 und SNC2

Ergebnisse

vollständig zu verhindern. Lysin-49 und Lysin-75 sind mögliche Kandidaten, an der eine zusätzliche Ubiquitylierung stattfinden könnte. Unter dem endogenen Promotor konnte SNC1-K49R im Vergleich zu den anderen Mutanten nur mit sehr geringem Anteil detektiert werden. Die Detektion von SNC1-K75R Protein, vom endogenen Promotor aus exprimiert, war vergleichbar mit den anderen Mutanten, in überexprimierenden Vektoren aber kaum detektierbar. Erklärung dafür könnte eine reduzierte Expression oder ein erhöhter Abbau dieser Mutanten Proteine sein. Der physiologische Grund für dieses Verhalten von K49R und K75R Mutanten ist unbekannt.

Ergebnisse

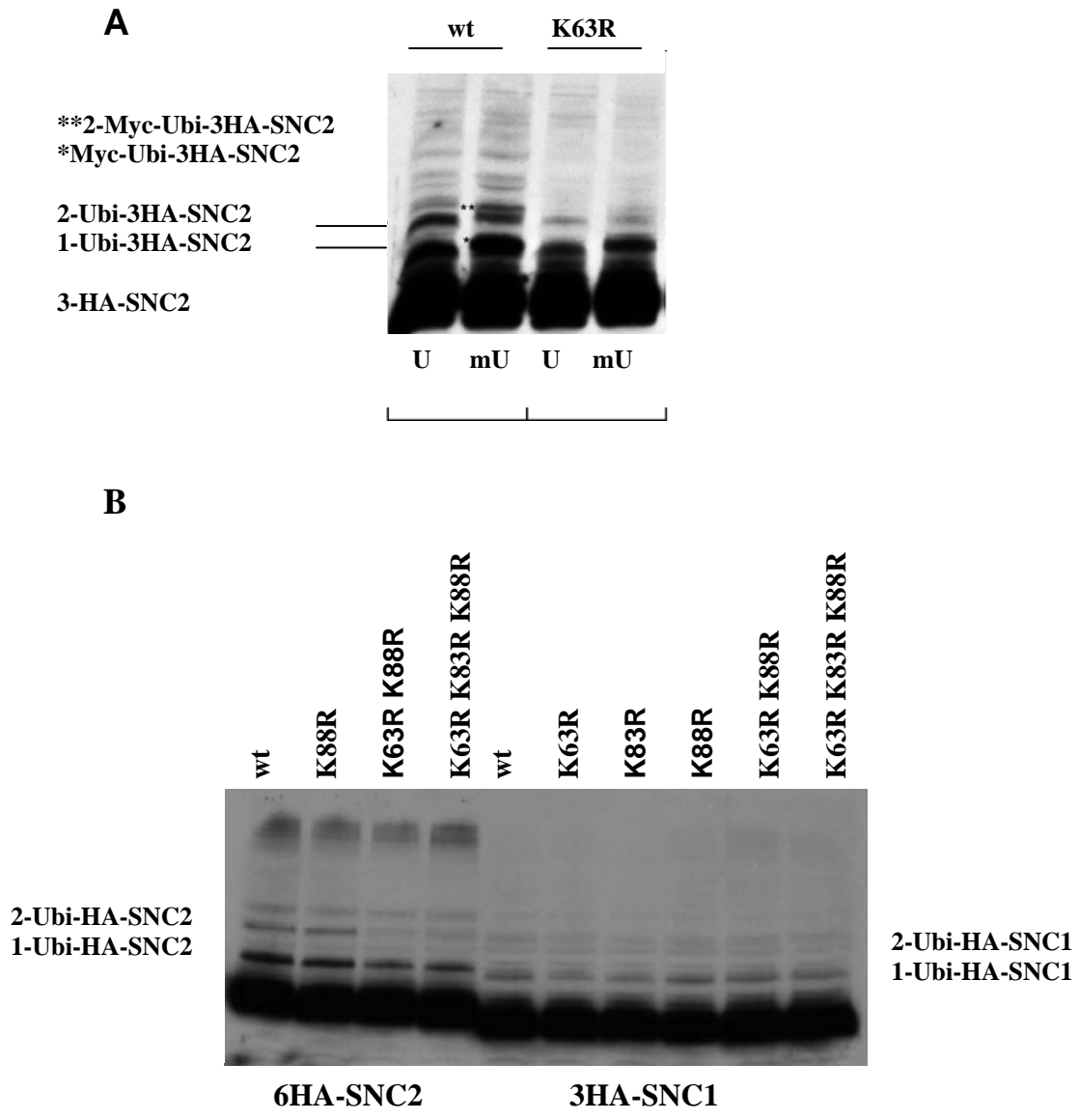


Abbildung 2-4: SNC2 wird am Lysin-63 ubiquityliert. **A.** Vergleich des Einbaus von Ubiquitin (U) und myc-Ubiquitin (mU) in Zellen, die 6HA-SNC2 und 6HA-SNC2(K63R) vom endogenen Promotor aus exprimieren. **B.** Vergleich des Einbaus von Ubiquitin von 6HA-SNC2 und 3HA-SNC1 Lysin-zu-Arginin Mutanten, unter der Kontrolle des Galaktose induzierbaren Promotors. Der Nachweis erfolgte mit anti-HA Antikörper.

1.5 SNC1/SNC2 wird oligoubiquityliert

Für Membranproteine, die ubiquitinabhängig endozytiert werden, wurden kurze Ubiquitinketten aus zwei Ubiquitinen identifiziert, die über das Lysin-63 des ersten Ubiquitins verknüpft sind (Galan et al. 1997). Um zu testen, ob auch SNC1/SNC2 durch Lysin-63 verknüpfte Ketten modifiziert sind, wurde HA-SNC1 und HA-SNC2 in einem Stamm exprimiert, der nur die mutante Form von Ubiquitin (ubi-K63R) exprimieren, und deshalb keine K63-verknüpften Ketten mehr synthetisieren kann (Spence et al. 1995). Die Expression wurde im DF5 Wildtyp Stamm und isogenen Wildtypstamm von ubi-K63R, untersucht und miteinander verglichen.

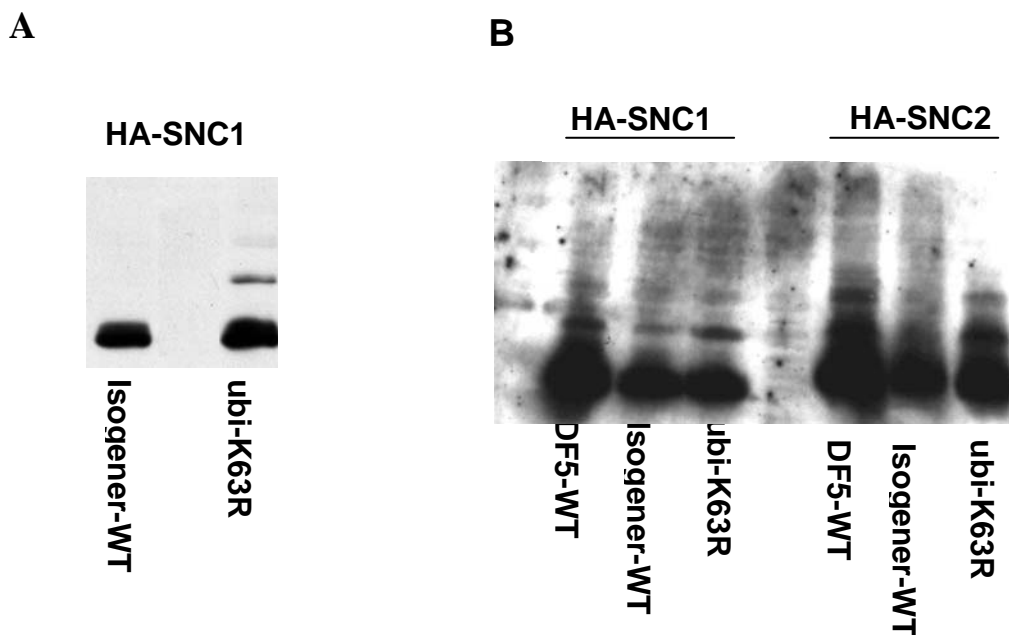


Abbildung 2-5: Die Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 erfolgt nicht durch Lysin-63 vernetzte Ketten. A. Vergleich der Expression von HA-SNC1, das vom endogenen Promotor aus exprimiert wird, im isogenen Wildtyp und der ubi-K63R-Mutante. **B.** Vergleich der Überexpression von Wildtyp HA-SNC1 und Wildtyp HA-SNC2 in DF5, im isogenen Wildtyp von ubi-K63R, und in ubi-K63R.

Es zeigte sich, dass im ubi-K63R SNC1 und SNC2 mono- und diubiquityliert waren (Abbildung 2-5). Auffällig war, dass im isogenen Wildtypstamm, die Ubiquitylierung geringer war als im DF5 Wildtypstamm (Abbildung 2-5B); in Zellen die HA-SNC1 chromosomal exprimierten, war nur die nicht-konjugierte Form von SNC1 erkennbar (Abbildung 2-5A). Grund dafür könnten die unterschiedliche Ubiquitinlevels in diesen Stämmen sein, die möglicherweise die Ubiquitylierung von SNC1 und SNC2 beeinflussen.

Da die diubiquitylierte Spezies von SNC1 und SNC2 im ubiK63R nicht verschwindet, kann angenommen werden, dass die Vernetzung des ersten Ubiquitin zum zweiten Ubiquitin nicht über das ubiquitininterne Lysin-63 erfolgt. Eine Vernetzung über ein anderes Lysin, beispielsweise Lysin-48,

kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da im vorhergehenden Experiment die Mutation des SNAREs an einem internen Lysin dafür verantwortlich war, dass das diubiquitylierte SNC2 stark reduziert war, monoubiquityliertes SNC2 nur gering reduziert war, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass das Plasmamembran v-SNARE nicht durch Ubiquitinketten modifiziert wird, sondern die Ubiquitin-Modifikation an mehreren SNARE-internen Lysinen erfolgt.

1.6 Die Ubiquitylierung von SNC1 ist abhängig von RSP5

Für die Identifizierung der Funktion der Ubiquitylierung von neuen Substraten ist es hilfreich, wenn die an der Ubiquitylierungsreaktion beteiligten Enzyme bekannt sind. RSP5 dient als Ligase für die Ubiquitylierung von Plasmamembran-Proteinen. Es schien daher möglich, dass SNC1/SNC2 ebenfalls RSP5 abhängig ubiquityliert wird. Der *trans*-SNARE Komplex wird nach der Membranfusion in einen *cis*-SNARE Komplex umgewandelt, in dem die SNAREs als Homodimere, v-v SNAREs und t-t SNAREs, in der Plasmamembran vorliegen. Die Auflösung des *cis*-SNARE Komplexes könnte durch Ubiquitin-Bindefaktoren ausgelöst werden, die das ubiquitylierte SNARE erkennen, und dem disassemblierenden Komplex zuführen. Ein ähnliches Szenario wurde für den Transkriptionsfaktor SPT23 beschrieben, der in der ER-Membran als Dimer vorliegt. Hier führt die RSP5 abhängige Ubiquitylierung zur Erkennung durch den Ubiquitin-bindenden CDC48^{UFD1/NPL4} Disassemblierungsfaktor (Rape et al. 2001).

rsp5-1 ist eine konditional letale Mutante von RSP5, in der das Leucin-733, das sich in der HECT-Domäne befindet, durch ein Serin ersetzt ist. *rsp5-2* ist eine konditionale Mutante von RSP5, die als Suppressor eines Spleißing-Defekts isoliert wurde (Seraphin B. nicht veröffentlicht).

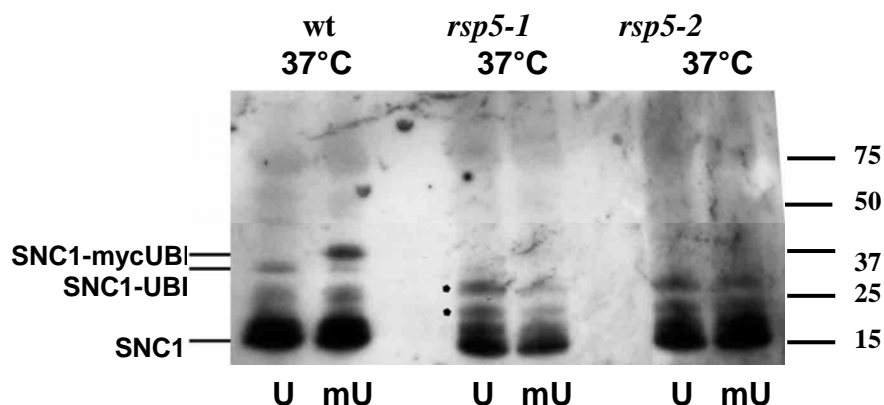


Abbildung 2-6: Für die Ubiquitylierung von SNC1 wird funktionelles RSP5 benötigt. Immunpräzipitation von HA-SNC1 aus wt Zellen, *rsp5-1* Zellen und *rsp5-2* Zellen in denen Ubiquitin (U) und myc-Ubiquitin (mU) exprimiert wurde. v neu entstandene Banden.

HA-SNC1, das unter Kontrolle des endogenen Promotors stand, wurde zusammen mit Ubiquitin oder Myc-Ubiquitin in *rsp5-1* und *rsp5-2* Mutanten

unter restriktiven Bedingungen exprimiert und immunpräzipitiert. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen konnte keine Ubiquitylierung in *rsp5-1* und in *rsp5-2* mutanten Zellen festgestellt werden (Abbildung 2-6). Stattdessen traten in beiden Mutanten zwei neue Banden auf, die nicht mit der ubiquitylierten Spezies in Wildtyp-Zellen übereinstimmten. Daraus läßt sich schließen, dass RSP5 die Ubiquitylierung von SNC1 katalysiert. Bei den neuen akkumulierenden Banden könnte es sich um bereits für SNC1 bekannte Modifizierungen handeln. Hyperphosphorylierung oder Palmitoylierung kann durch die Inhibierung der Ubiquitylierungsreaktion, verstärkt auftreten.

2. Ubiquitylierung ist ein Signal für Lokalisierung

2.1 Die Bildung des *trans*-SNARE Komplexes wird durch die Modifikation am Lysin-63 nicht beeinflusst

Der *trans*-SNARE Komplex, der zwischen Vesikel und Plasmamembran gebildet wird, besteht aus dem SNAP-25 Homologen SEC9, dem t-SNARE-SSO1, dem v-SNARE SNC1 und dem α -SNAP SEC17 im Verhältnis 1:1:1:3 (Rossi et al. 1997). *In vitro* besitzt der hetero-oligomere Komplex SSO1-SEC9 eine besonders hohe Affinität zu SNC1, während die Proteine für sich allein keine Bindungsaffinität zu SNC1 besitzen (Rossi et al. 1997). Die Regulation und Formierung des SSO1-SEC9 Komplexes scheint daher für die Membranfusion wichtig zu sein.

SNC1 oder SNC2 sind Suppressoren der temperatursensitiven Mutante *sec9-4* (Couve et al. 1994). Die Mutation am Glycin-458 in *sec9-4* befindet sich zwischen zwei Coiled-Coils, und ist in allen SNAP-25 Homologen konserviert (Novick et al. 1980; Brennwald et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass in *sec9-4* Zellen der Komplex zwischen SEC9 und SSO1 nicht mehr gebildet werden kann. SNC1 kann diesen Komplex *in vitro* und *in vivo* stabilisieren (Rossi et al. 1997).

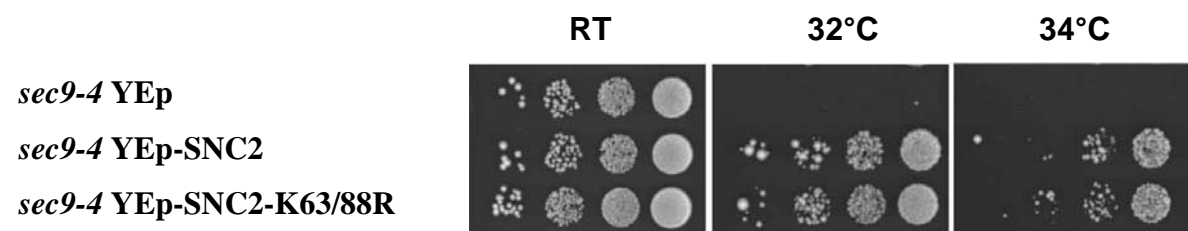


Abbildung 2-7: SNC2-K63/88R wird in den *trans*-SNARE Komplex eingebaut. Das Wachstum (serielle Verdünnungsreihe) von *sec9-4* Zellen in Anwesenheit von leerem Vektor (Yeast Episomal plasmid; YE_p), Wildtyp-SNC2 (YE_p-SNC2) und SNC2-K63/88R (YE_p-SNC2-K63/88R) wurde miteinander verglichen.

Um festzustellen, ob die identifizierte Ubiquitinierungsstelle am Lysin-63 von SNC2 einen Einfluß auf die genetische Beziehung von SNC2 und SEC9 hatte, wurde SNC2 und SNC2-K63R (beziehungsweise SNC2-K63/88R) in

Ergebnisse

sec9-4 Zellen überexprimiert, und das Wachstum der Zellen unter restriktiven Bedingungen überprüft.

Es zeigte sich, dass die Suppression des *sec9-4* Phänotyps durch Wildtyp SNC2 und SNC2-K63R Mutante gleich gut erfolgte (Abbildung 2-7). Man kann daraus schließen, dass die Substitution des Lysin-63 durch Arginin die Faltung des Proteins nicht beeinträchtigt, und SNC2-K63R an der Plasmamembran als Teil des *trans*-SNARE Komplexes lokalisiert. Die Ubiquitylierung von SNC2 am Lysin-63 besitzt daher anscheinend keine Bedeutung für die Bildung des *trans*-SNARE Komplexes.

2.2 SNC2 ist ein langlebiges Protein

Um den mögliche Proteasom-abhängigen Abbau von SNC2 festzustellen, wurde HA-Epitop markiertes SNC2 in Wildtyp Zellen und in den *pre1-1* und *cim3-1* Proteasom-Mutanten überexprimiert, durch Cycloheximid die Proteintranslation gestoppt, und die Proteinmenge von SNC2 zeitlich verfolgt. Die proteasomale *pre1-1* Mutante trägt eine Mutation in einer strukturellen β -Untereinheit des 20S-Proteasoms und stabilisiert die Modellsubstrate Ubiquitin-Pro- β -gal, Leu- β -gal und Arg- β -gal. RPT6 ist eine ATPase-Untereinheit des Proteasoms; in einer konditional lethalen Mutante von RPT6, *cim3-1*, werden unter restriktiven Temperaturbedingungen Ubiquitin-Pro- β -gal, aber nicht Leu- β -gal und Arg- β -gal stabilisiert. *cim3-1* ist eine Proteasom-Mutante die zur Arretierung der Zellen in G2 führt (Ghislain et al. 1993).

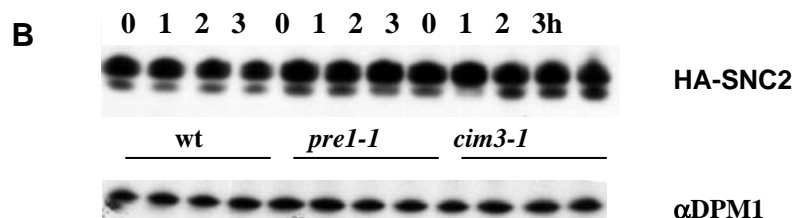


Abbildung 2-8: SNC1/SNC2 wird teilweise Proteasom-abhängig abgebaut. Cycloheximid Abschaltungs-Experiment zur Bestimmung der Abbaurate von HA-SNC2 in wt, *pre1-1* und *cim3-1*. HA-SNC2 wurde chromosomal, vom endogenen Promoter aus exprimiert. Gesamt-Protein-Extrakt wurden 0, 1, 2 und 3 Stunden nach Zugabe von Cycloheximid präpariert. α DPM1=Ladekontrolle.

Es zeigte sich, dass das getestete SNARE SNC2 eine sehr lange Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden in Wildtypzellen besitzen. In der *pre1-1* Mutante schien das Protein ganz leicht stabilisiert zu werden. In *cim3-1* Mutanten verhielt es sich ähnlich (Abbildung 2-8). Die Beteiligung des Proteasoms am Abbau von SNC2 kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Stabilisierung von SNC2 in *pre1-1* und *cim3-1*, die drei Stunden nach Zugabe von Cycloheximid gefunden wurde, kann jedoch auf unspezifische Effekte durch die Hemmung der Proteinbiosynthese zurückgeführt werden. Da

es sich mit SNC2 um ein relativ stabiles Protein zu handeln scheint, wird angenommen, dass das Proteasom für die Regulation der SNAREs SNC2 eine untergeordnete Rolle spielt.

2.3 Lokalisation von GFP-SNC1 deuten auf Regulation durch die Vakuole

Es gibt in der Literatur zahlreiche Beispiele von ubiquitylierten Plasmamembran-Proteinen, die durch Endozytose an die Vakuole gelangen, und dadurch über Abbau durch vakuoläre Proteasen reguliert werden (siehe Einleitung). Um zu testen, ob SNC1/SNC2 durch Abbau in der Vakuole reguliert wird, wurde die Lokalisation mit N-terminal GFP markiertem SNC1 endogen oder überexprimiert in Wildtyp-Zellen getestet.

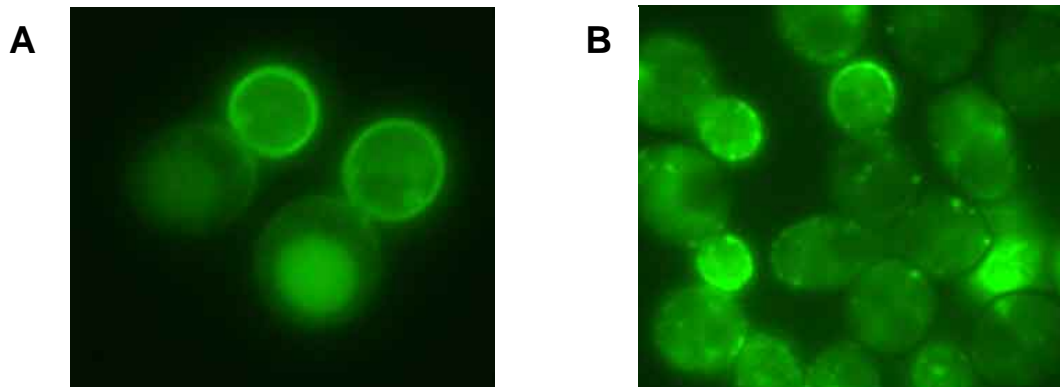


Abbildung 2-9: GFP-SNC1 lokalisiert an der Plasmamembran und in der Vakuole. A. Floureszenzmikroskopie mit überexprimiertem GFP-SNC1 B. Floureszenzmikroskopie mit chromosomal exprimiertem GFP-SNC1 in Wildtyp Zellen.

Die Lokalisation von GFP-SNC1 an der Plasmamembran war in beiden Stämmen weitgehend übereinstimmend. GFP-SNC1 lokalisiert bevorzugt in der Plasmamembran der Tochterzellen. In den Mutterzellen wird SNC1 vor allem im Lumen der Vakuole gefunden. Eine möglich Erklärung für die Akkumulation von GFP-SNC1 im Vakuolen-Lumen, könnte das Überangebot von Substrat und die limitierende Menge an vakuolären Proteasen sein (Abbildung 2-9A). Wenn physiologische Mengen SNC1 exprimiert werden, sind die mit der Vakuolenmembran verschmelzenden Vesikel sichtbar (Abbildung 2-9B).

2.4 Ubiquityliertes SNC1 befindet sich an der Plasmamembran

Um festzustellen in welchem Kompartiment die Ubiquitylierung von SNC1 stattfindet, wurde die Lokalisation von GFP-SNC1 in verschiedenen Mutanten, die den Transportweg vom ER zur Plasmamembran blockieren, untersucht (Abbildung 2-10). Gleichzeitig wurde der Ubiquitylierungsgrad von SNC1, in

manchen Fällen zusätzlich von SNC2, bestimmt. Für die Blockierung des Transportweges vom ER zu Golgi wurden die temperatursensitiven Allele *sec17-1* und *sec18-1* ausgewählt. SEC17 ist das Hefehomologe von α -SNAP (soluble NSF attachment protein) und bekannt als Aktivator von SEC18/NSF. Da SEC18/NSF sowohl für homotypische als auch heterotypische Membranfusion essentiell ist, sollte die Expression von SNC1 in der *sec17-1* und *sec18-1* Mutante zum Block des Vesikelflußes und zur Akkumulation im ER führen.

Für die Hemmung des Vesikelflußes zwischen Golgi und Endosomen wurden Stämme, die das temperatursensitive Allel *sed5-1* trugen, verwendet. SED5 ist ein Syntaxin homologes t-SNARE, befindet sich im *cis*-Golgi, und wird für den Transport von ER zum Golgi benötigt (Cao et al. 1998). SEC1 ist ein SNARE-Bindeprotein, das für die Exozytose essentiell ist. In *sec1-1* Mutanten können verschiedene Proteine nicht mehr an die Zelloberfläche gebracht werden (Bisson 1988).

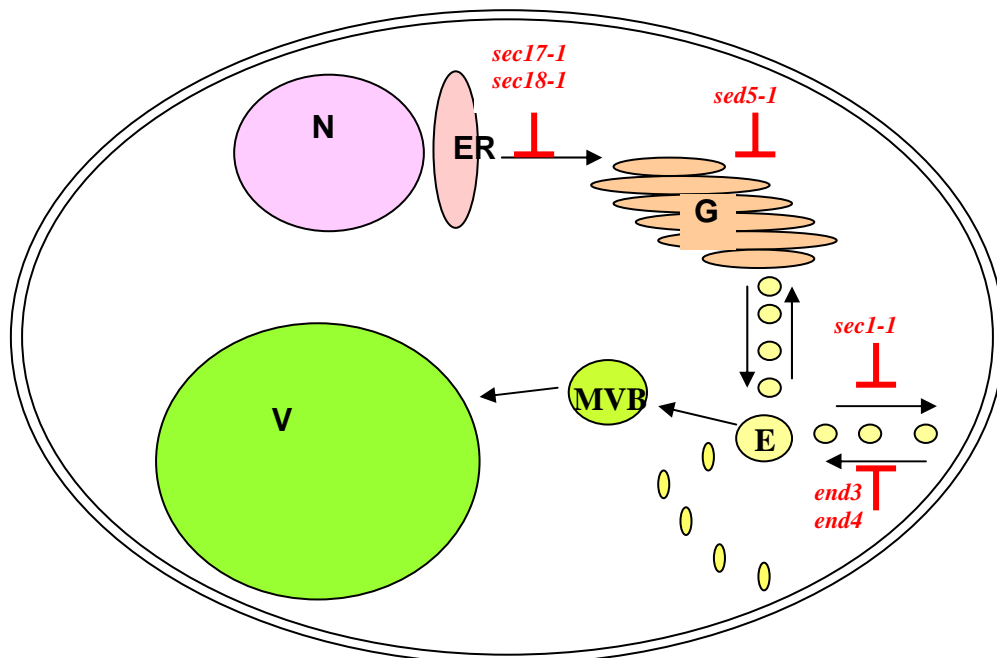


Abbildung 2-10: Mutanten die den Vesikel-Transport vom ER zur Plasmamembran blockieren. *sec17-1*, *sec18-1*, *sec1-1* sind temperatursensitive Mutanten. *end3* und *end4* sind Deletions-Mutanten. Zellkern (N), Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi (G), Endosom (E), multivesikulärer Körper (MVB), Vakuole (V).

Um die Endozytose zu hemmen, wurden *end3* und *end4* Mutanten verwendet. END3 wird für die Internalisierung von einer Reihe von Membranproteinen benötigt (Raths et al. 1993; Munn et al. 1994), außerdem ist END3 an der Organisation von Actinfilamenten (Benedetti et al. 1994), und der Organisation und Biogenese der Zellwand beteiligt (Tang et al. 2000). END4 ist eine strukturelle Komponente des Aktinzytoskeletts (Holtzman et al. 1993).

In *sec17-1* und *sec18-1* Mutanten akkumulierte GFP-SNC1 bei restriktiver Temperatur im ER (Abbildung 2-11A), in *sed5-1* Mutanten in Golgi-Vesikeln (Abbildung 2-12A), in *sec1-1* Mutanten in Endosomen (Abbildung 2-13A) und in *end3*, *end4* an der Plasmamembran (Abbildung 2-14A). Dies

zeigte, dass die Blockierung des Vesikeltransports vollständig erfolgte. Unter denselben Bedingungen wurde HA-SNC1, in manchen Fällen HA-SNC2, zusammen mit Ubiquitin und Myc-Ubiquitin in den verschiedenen Stämmen exprimiert.

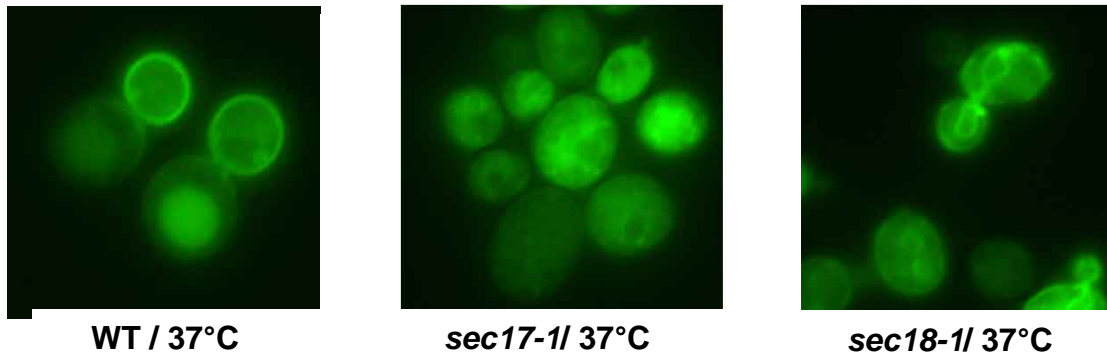
Es zeigte sich, dass SNC1 im ER (Abbildung 2-11B,C), im Golgi (Abbildung 2-12B) und in sekretorischen Endosomen (Abbildung 2-13B) nicht ubiquityliert war. In *end3* und *end4* Mutanten führte die Akkumulation von GFP-SNC1 an der Plasmamembran zur Akkumulation oligoubiquitylierter Spezies (Abbildung 2-14B). In *sed5-1* Mutanten verhielt sich SNC2 gleich wie SNC1 (Abbildung 2-12B).

SNC1 wird offensichtlich an der Plasmamembran durch Ubiquitin modifiziert. Das Signal für GFP-SNC1 in *end3* und *end4* Mutanten hat im Vergleich zu Wildtypzellen eine vielfach höhere Intensität, zugleich wird kein Signal im Lumen der Vakuole sichtbar. Dieses Phänomen ist durch die Tatsache erklärbar, dass in *end3* und *end4* Mutanten keine endosomale Vesikelbildung mehr stattfinden kann. Es ist möglich, dass die Ubiquitylierung von SNC1 an der Plasmamembran, ähnlich wie in STE2, als Endozytose Signal dient. Lysin Mutanten, die nicht mehr ubiquityliert werden, müssten in diesem Fall an der Plasmamembran akkumulieren.

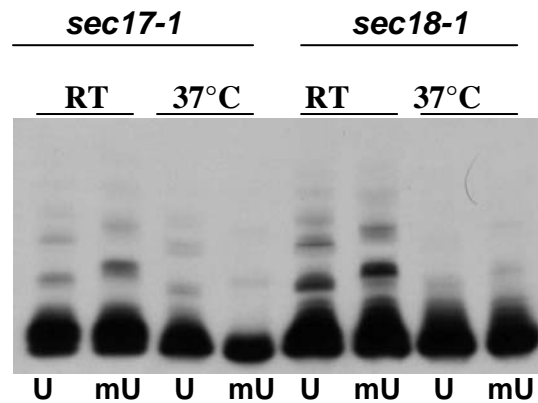
Die primäre Funktion des SNAREs SNC1/SNC2 ist die Bildung eines *trans*-SNARE Komplexes, die zur Membranfusion zwischen Vesikel und Plasmamembran führt. Hier wurde gezeigt, dass das SNC1 SNARE an der Plasmamembran ubiquityliert ist. Während der Sekretion von SNC1 zur Plasmamembran findet keine Ubiquitylierung statt. Daraus lässt sich ableiten, dass zum Zeitpunkt der Bildung des *trans*-SNARE Komplexes, also wenn das v-SNARE noch in der Vesikelmembran verankert ist, SNC1 nicht ubiquityliert wird, und daher für die Membranfusion selbst nicht benötigt wird. Die Ubiquitylierung tritt erst zu einem späteren Zeitpunkt auf, wenn das SNARE in der *cis*-Konfiguration an der Plasmamembran vorliegt. Es ist möglich, dass die Ubiquitylierung für die Auflösung der *cis*-SNARE Moleküle in der Plasmamembran benötigt wird.

Ergebnisse

A



B



C

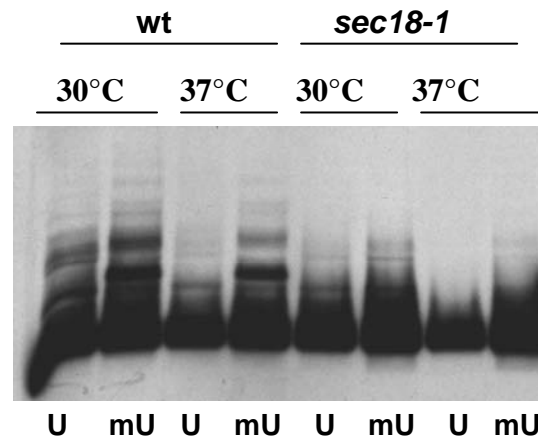
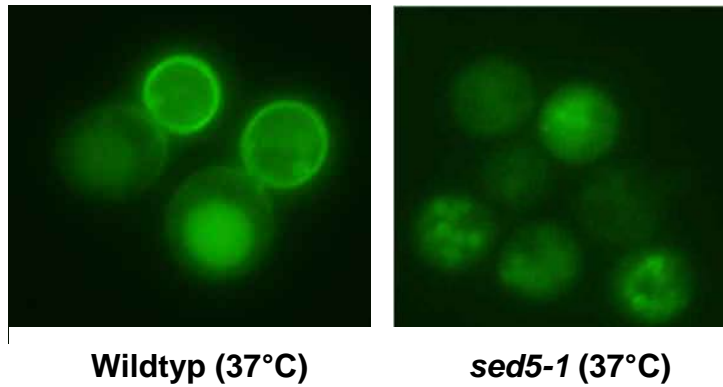


Abbildung 2-11: In *sec17-1* und *sec18-1* Zellen akkumulieren nicht-ubiquityliertes SNC1 im ER. **A.** Lokalisation von GFP-SNC1 in *sec17-1* und *sec18-1* Stämmen, die bei permissiver und restriktiver Temperatur gezüchtet wurden. **B.** Gesamtprotein mit überexprimiertem HA-SNC1; Vergleich des Einbaus von Ubiquitin (U) und myc-Ubiquitin (mU) unter permissiven (RT) und restriktiven (37°C) Bedingungen in *sec17-1* und *sec18-1*. **C.** Gesamtprotein mit überexprimiertem HA-SNC1; Vergleich des Einbaus von Ubiquitin (U) und myc-Ubiquitin (mU) bei 30°C und 37°C in *sec18-1* im Vergleich mit wt.

Ergebnisse

A



B

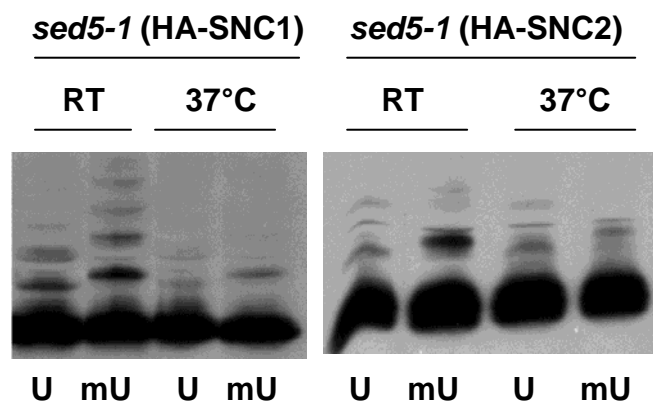
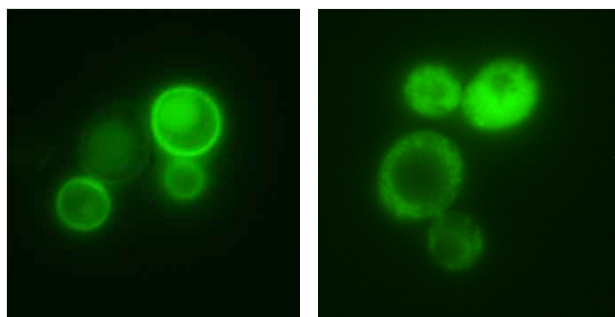


Abbildung 2-12: In *sed5-1* Zellen akkumuliert nicht-ubiquityliertes SNC1 in Golgi Vesikeln. **A.** Lokalisation von GFP-SNC1 in *sed5-1* Stämmen, die bei restriktiver Temperatur gezüchtet wurden, im Vergleich mit Wildtyp-Stamm **B.** Gesamtprotein mit überexprimiertem HA-SNC1 und HA-SNC2 in *sed5-1*; Vergleich des Einbaus von Ubiquitin (U) und myc-Ubiquitin (mU) unter permissiven (RT) und restriktiven (37°C) Bedingungen.

A



Wildtyp (37°C)

sec1-1 (37°C)

B *sec1-1* (HA-SNC1)

RT 37°C

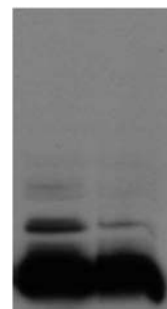


Abbildung 2-13: In *sec1-1* Zellen akkumuliert nicht-ubiquityliertes SNC1 in frühen Endosomen. **A.** Lokalisation von GFP-SNC1 in *sec1-1* Stämmen, die bei restriktiver Temperatur gezüchtet wurden, im Vergleich mit Wildtyp-Stamm **B.** Gesamtprotein mit überexprimiertem HA-SNC1 in *sec1-1*; Vergleich des Einbaus von Ubiquitin (U) unter permissiven (RT) und restriktiven (37°C) Bedingungen.

Ergebnisse

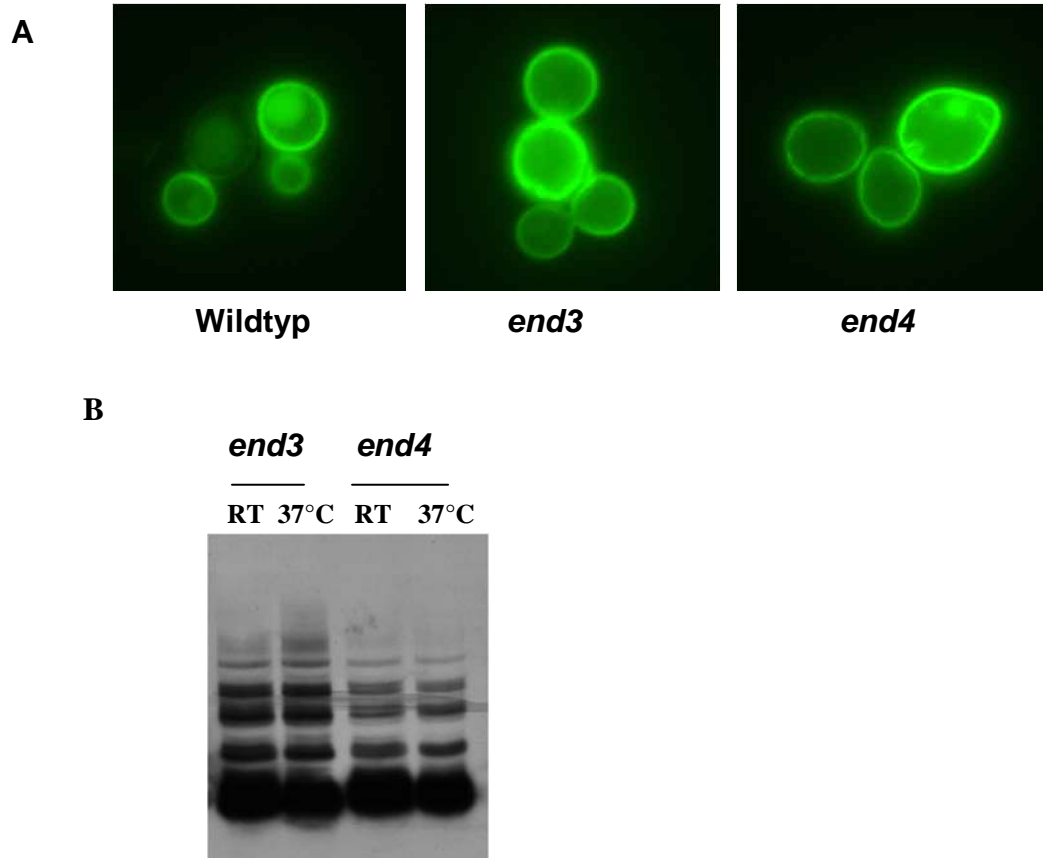


Abbildung 2-14: In *end3* und *end4* Zellen akkumuliert multiubiquityliertes SNC1 an der Plasmamembran. A. Lokalisation von GFP-SNC1 in *end3* und *end4* Stämmen im Vergleich mit Wildtyp-Stamm **B.** Gesamtprotein mit überexprimiertem HA-SNC1 in *end3* und *end4* mit überexprimiertem HA-SNC1 bei RT und 37°C.

2.5 Für die Lokalisierung von SNC1 in die Plasmamembran ist funktionelles RSP5 notwendig

In *rsp5-1* und *rsp5-2* wird SNC1/SNC2 nicht mehr ubiquityliert (siehe Abschnitt 1.6). Es sollte die Lokalisation in *rsp5-1* unter permissiven und restriktiven Temperaturbedingungen untersucht werden. Dazu wurde GFP-SNC1 in *rsp5-1* exprimiert, und die Lokalisation mikroskopisch bestimmt. GFP-SNC1 lokalisierte unter permissiven Bedingungen in der Plasmamembran und im Vakuolenlumen, wie bereits aus Wildtypzellen bekannt. In *rsp5-1* Zellen, die bei 37°C kultiviert wurden, war das Protein nicht mehr an der Plasmamembran und im Lumen der Vakuole lokalisiert. Das Protein war punktförmig in Aggregaten in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran verteilt (Abbildung 2-15).

Es stellt sich die Frage, wie diese SNARE-Aggregate an der Plasmamembran zustande kommen können. Unter Annahme, dass der endozytotische Weg durch eine *rsp5-1* Mutation betroffen ist, läßt die Lokalisation von oligoubiquityliertem SNC1 in *end3* und *end4* Mutanten den Schluß zu, dass die fehlende Ubiquitylierung des SNAREs dazu führt, dass die *cis*-SNARE Aggregate an der Plasmamembran nicht mehr aufgelöst werden können. Die beobachteten Aggregate in *rsp5-1* können darauf

hinweisen, dass die Ubiquitylierung als Erkennungssignal dienen könnte, um zu den Stellen, an der endozytotische Vesikelbildung stattfindet, sortiert zu werden (Dupre et al. 2003).

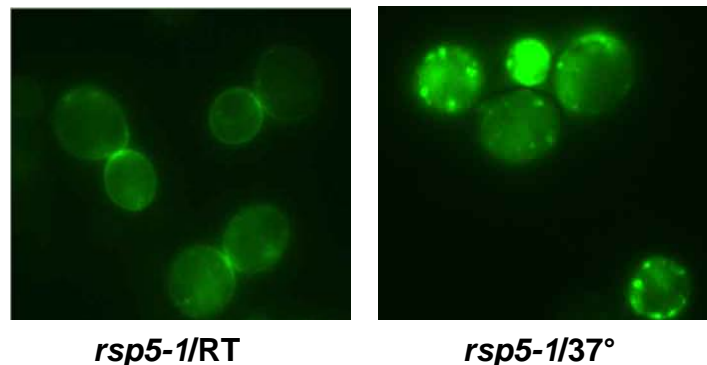


Abbildung 2-15: Nicht-ubiquityliertes SNC1 lokalisiert in Vesikeln nahe der Plasmamembran. Lokalisation von GFP-SNC1 in *rsp5-1* Mutanten unter permissiven (RT) und restriktiven (37°C) Temperaturbedingungen.

2.6 SNC1-K63R lokalisiert in der Vakuolenmembran

Um die in Abschnitt 1.4 bestimmte Ubiquitylierungsstelle von SNC2 am Lysin-63 näher zu charakterisieren, sollte die Frage beantwortet werden, ob sich hinsichtlich der Lokalisation des SNAREs eine Veränderung ergibt. In einem unabhängigen Experiment, bei dem neue Ubiquitin-Konjugate identifiziert werden sollten, konnte SNC1 und SNC2 durch Massenspektroskopie identifiziert werden. Zugleich wurde auch für beide Proteine das Lysin-63 als Ubiquitylierungsstelle identifiziert (Peng et al. 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass eine mögliche Lokalisationsänderung von SNC1-K63R auch in SNC2-K63R eintritt. Die Lokalisations-Experimente wurden mit GFP-SNC1 durchgeführt.

Durch Mutagenese des 2µ Plasmids pRS-416-GFP-SNC1 (Lewis et al. 2000) entstand das Plasmid pRS-416-GFP-SNC1-K63R. Die Plasmide wurden in den Wildtypstamm transformiert und die Lokalisation von GFP-SNC1 Wildtyp und GFP-SNC1-K63R miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass das Wildtyp-Protein in der Plasmamembran und der Vakuole zu finden war. GFP-SNC1-K63R wurde zwar noch in die Plasmamembran lokalisiert, nicht aber ins Lumen der Vakuole. Stattdessen wurde ein Ring um die Vakuole sichtbar, vermutlich die Vakuolenmembran (Abbildung 2-16).

Die Lys-63 Stelle, und die Ubiquitylierung am Lysin-63, scheint für den Eintritt in das Lumen der Vakuole von Bedeutung zu sein. Hinweise, dass Ubiquitin für den Eintritt in das Lumen der Vakuole wichtig ist, konnte schon zuvor gezeigt werden. Ein SNC1-Fusionsproteins, das durch eine Leserahmenfusion N-terminal mit Ubiquitin kovalent verknüpft war, lokalisierte, im Gegensatz zum Wildtyp-Protein SNC1, das sich an der Plasmamembran und in das Lumen der Vakuole befand, ausschließlich im

Ergebnisse

Lumen der Vakuole, nicht aber an der Plasmamembran (Reggiori et al. 2002).

Es ist bereits bekannt, dass Ubiquitylierung von endosomalen Membranproteinen als positives Signal für den Transport über multivesikuläre Kompartimente (MVB) zur Vakuole dient (Katzmann et al. 2001; Reggiori et al. 2001; Urbanowski et al. 2001). Dabei werden die ubiquitylierten Substrate von VPS-Proteinen erkannt, darauf folgend in das intralumenale MVB Vesikel invaginiert, zuletzt das MVB Vesikel mit der Vakuolenmembran fusioniert und damit die eingeschlossenen Vesikel in das Lumen der Vakuole entlassen (Katzmann et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass in der *vps4*-Mutante, die die Sortierung in MVB Vesikel inhibiert, die Lokalisation von SNC1 in keiner Weise beeinträchtigt ist (Lewis et al.). Daraus wurde gefolgert, dass SNC1 nicht über MVB-Vesikel an die Plasmamembran gelangt.

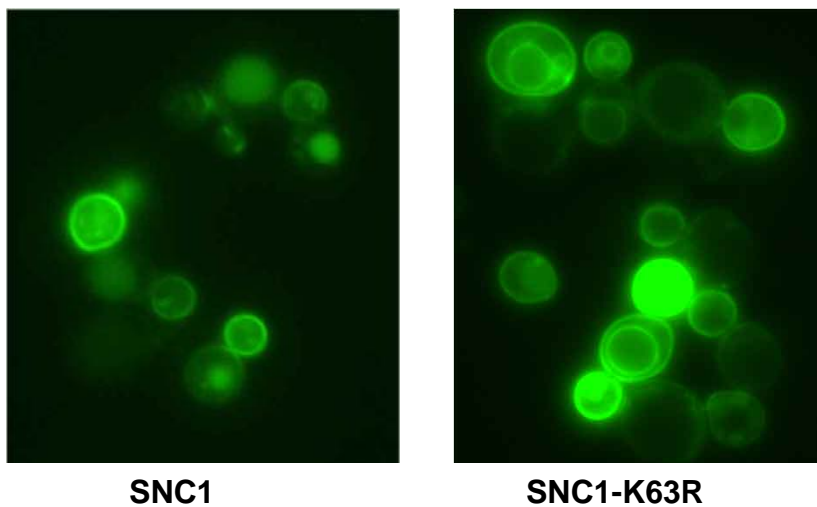


Abbildung 2-16: Für die Lokalisation von SNC1 in die Vakuole ist die Ubiquitylierung von SNC1 am Lysin-63 notwendig. Vergleich von GFP-SNC1 und GFP-SNC1-K63R im Wildtyp-Stamm.

Um zu testen, ob der Austausch weiterer Lysine mit Arginin in SNC1 zu einer Lokalisationsänderung führen, wurden diese mit GFP-SNC1 getestet. Zuvor wurde schon gezeigt, dass Lysin-83 und Lysin-88 als Ubiquitylierungsstellen nicht verwendet werden (Abbildung 2-4B). Hier konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Lysin-83 und Lysin-88 auch die Lokalisation von SNC1 nicht beeinflussen (Abbildung 2-17A,B). Die Doppelmutante SNC1-K63R K88R und die Vierfachmutante SNC1-K63R K83R K88R K91R hingegen akkumulieren, wie zuvor schon für die Einzelmутante SNC1-K63R gezeigt, einen Teil des Proteins ringförmig, in der Membran, die vermutlich der Vakuolenmembran entspricht (Abbildung 2-17C,D).

Es bleibt zu klären, ob Lysin-49 oder Lysin-75 einen Einfluß auf die Lokalisation von SNC1 haben. Da in SNC2-K63R Mutanten die diubiquitylierte Spezies von SNC2 stark reduziert ist, die monoubiquitylierte Spezies deutlich vorhanden ist, scheint Lysin-63 nicht die einzige Ubiquitylierungsstelle zu sein (Abbildung 2-4A). Es ist möglich, dass die zweite Ubiquitylierung am Lysin-49 oder Lysin-75 erfolgt. Wenn diese Ubiquitylierungsstelle für die Sortierung von

Ergebnisse

der Plasmamembran in endozytotische Vesikel benötigt wird, könnte dies zu einer Akkumulation an der Plasmamembran, ähnlich wie sie in *rsp5-1* Mutanten gefunden wurde (Abbildung 2-15), führen.

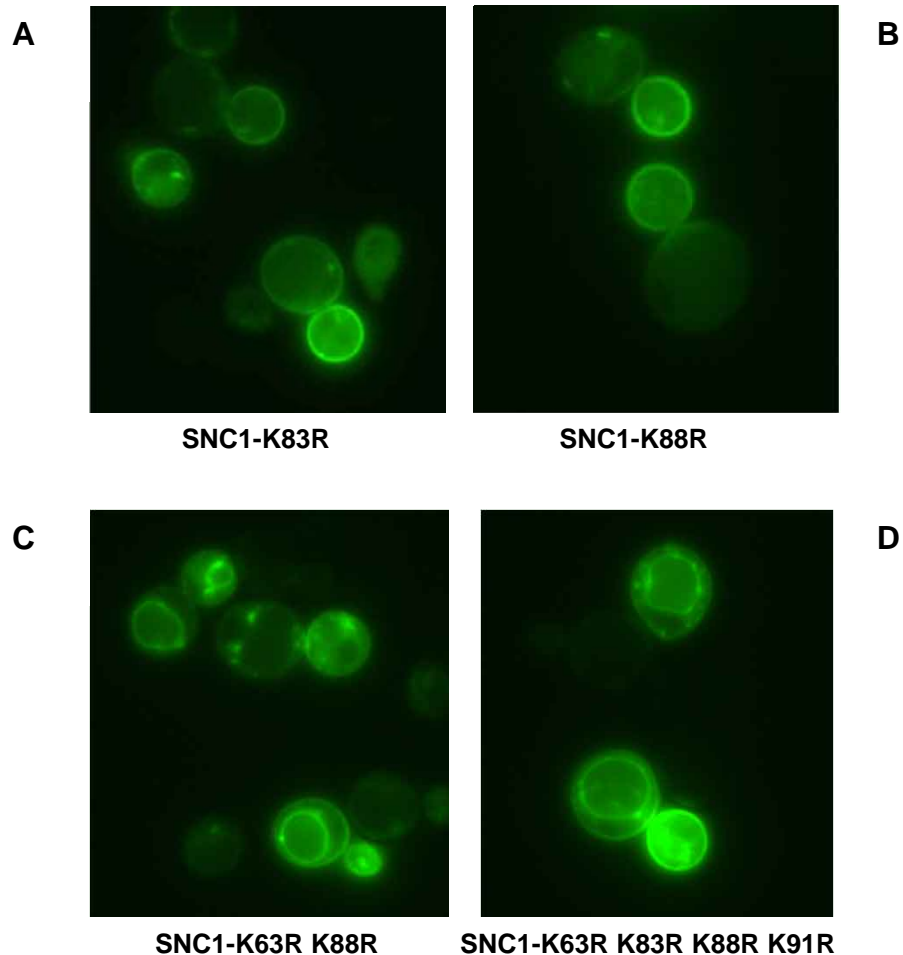


Abbildung 2-17: Die Lysin-63 Funktion ist konserviert. Lokalisation von GFP-SNC1(K88R), GFP-SNC1(K83R), GFP-SNC1(K63R K88R) und GFP-SNC1(K63R K83R K88R K91R).

2.7 Membranfraktionierung von SNC1

Um festzustellen inwieweit sich unterschiedlich modifizierten Spezies von SNC1, und eine zuvor beobachtete verkürzte Form von SNC1 (SNC1 Δ TM) (Abbildung 2-18), in ihrer Membranlöslichkeit unterscheiden, wurde die

Ergebnisse

Membranfraktion aus Zellen, die HA-SNC1 chromosomal, vom endogenen Promotor aus exprimierten, isoliert, und durch die Detergenzien SDS und Triton der Proteinanteil aus der Membran gelöst. SNC1 kann durch Inkubation mit 1 % Triton und 0,1 % SDS beinahe vollständig aus der Membran gelöst werden. Ubiquityliertes SNC1 war in gleichem Maße löslich wie nicht-ubiquityliertes SNC1 (Abbildung 2-18A). Die sequentielle Membranfraktionierung durch 13000 g und 20000 g zeigte, dass die verkürzte Form von SNC1 ohne die Transmembran-Domäne im 13000 g Überstand angereichert war, nicht aber im 13000 g Pellet, in der der Großteil von SNC1 fraktioniert wurde (Abbildung 2-18B). Daraus kann man ablesen, dass sich die verkürzte Form HA-SNC1 Δ TM zwar membrangebunden ist, jedoch sich eher in der vesikulären Fraktion als der Plasmamembran Fraktion befindet.

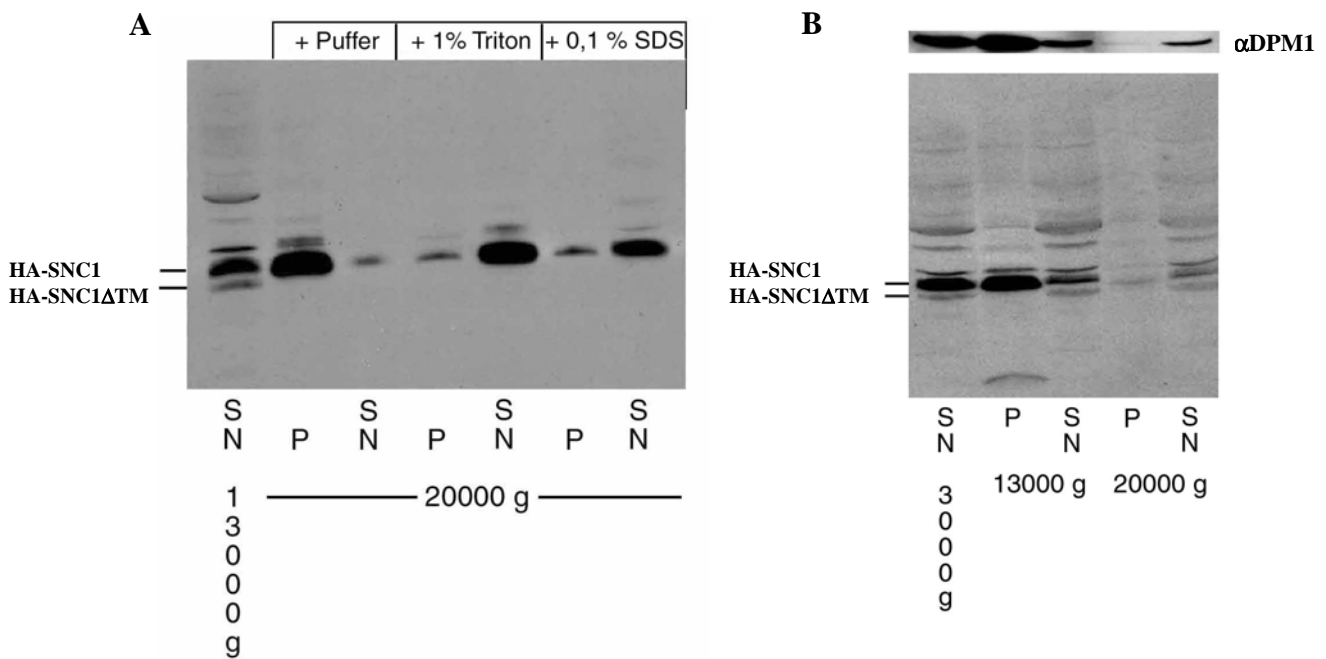


Abbildung 2-18: Volllängen SNC1 und monoubiquityliertes SNC1 lokalisieren in der Membranfraktion. A. Membranfraktionierung von HA-SNC1. 20000 g Pellet (P) und 20000 g Überstand (SN) nach Zugabe von Puffer (= Kontrolle), Triton, SDS. **B.** Fraktionierung von HA-SNC1 durch sequentielle Zentrifugation bei 3000 g, 13000 g und 20000 g.

3. Die Interaktion von SNC1 mit dem UBA-Domänen Protein DDI1

3.1 Die genetische Interaktion von DDI1 und SNC1/SNC2

Überexpression von DDI1, eines der sechs UBA (Ubiquitin associated)-Domänen enthaltenden Proteine in Hefe, kann das Wachstum von *sec9-4* Zellen in denen SNC1 überexprimiert wird, inhibieren. Zudem interagiert SNC1 sowohl im Zwei-Hybrid Test mit DDI1 als auch in Immunpräzipitations-Experimenten (Lustgarten et al. 1999).

Die 2-Hybrid Interaktion konnte nicht reproduziert werden. Grund dafür könnte das unterschiedliche 2-Hybrid-System sein, das verwendet wurde. Die genetische Interaktion von SNC1 mit *sec9-4* Mutanten konnte reproduziert werden. Zusätzlich konnte die genetische Interaktion SNC2 mit *sec9-4*, und die Suppression des Wachstums durch DDI1 gezeigt werden (Abbildung 2-19).

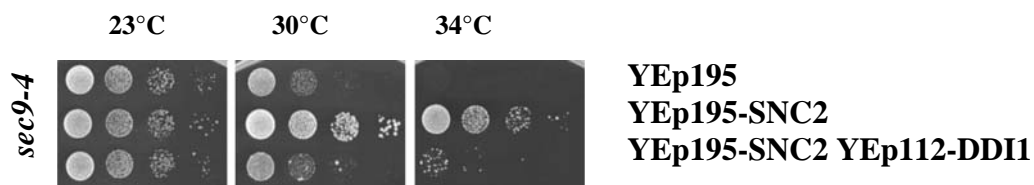


Abbildung 2-19: Die Suppression des Wachstums von *sec9-4* durch SNC2 ist DDI1 abhängig. A. Vergleich des Wachstums von *sec9-4* mit leerem Vektor (YEp195), SNC2 (YEp195-SNC2) und SNC2 mit ADH-DDI1 (YEp195, YEp112-DDI1) in seriellen Verdünnungreihen.

Diese genetischen Daten eröffneten die Frage, ob DDI1 das SNARE SNC1 in seiner Stabilität positiv oder negativ beeinflussen konnte. Daher sollte die Stabilität von SNC1 in Promotor Abschaltungs-Experimenten untersucht werden, wenn DDI1 überexprimiert wurde. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Fehlen von DDI1 ($\Delta ddi1$) die Stabilität von SNC1 beeinflussen konnte. Da bei Expression von HA-SNC1 eine verkürzte Form von SNC1, SNC1 ohne die Transmembran-Domäne entstand (Abbildung 2-18), sollte untersucht werden, ob die Aspartyl-Protease-Domäne von DDI1, einen Einfluß auf die Stabilität von SNC1 hatte. Dazu wurde Proteaseinhibitor Pepstatin verwendet, durch das Aspartyl-Protease-Domänen inhibiert werden (Seelmeier et al. 1988).

HA-SNC1 wurde durch einen Galaktose induzierbaren Promotor exprimiert und der Verlauf der Proteinmenge von DDI1 in Wildtyp Zellen, Zellen in denen DDI1 fehlte ($\Delta ddi1$), und in denen DDI1 konstitutiv überexprimiert wurde (p423-ADH-DDI1), bestimmt. Zusätzlich wurde ein

Ergebnisse

Ansatz HA-SNC1 exprimierende Zellen mit Pepstatin behandelt und auf gleiche Weise untersucht.

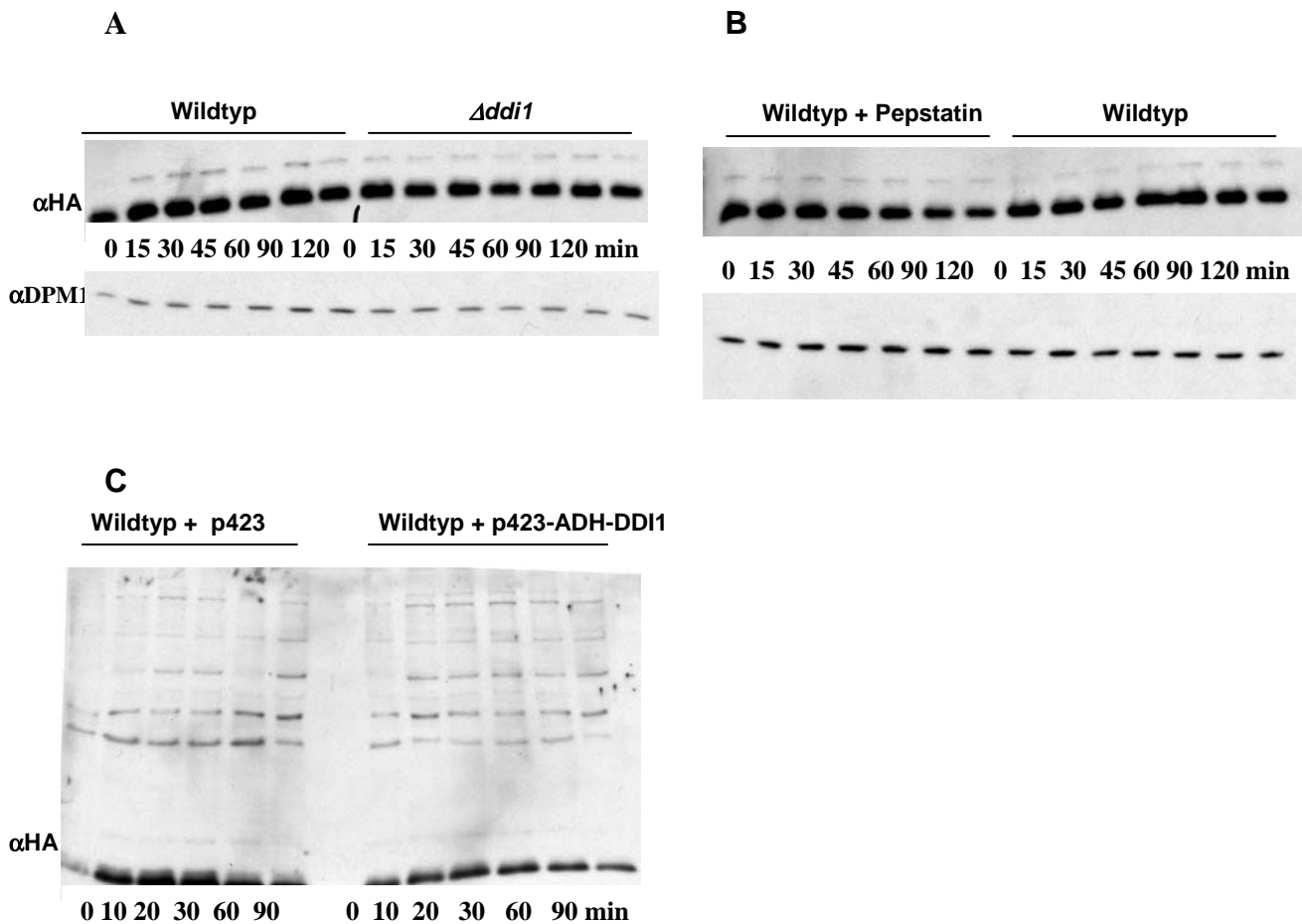


Abbildung 2-20: Der Einfluß von DDI1 auf die Stabilität von SNC1. Promotor Abschaltungs-Experimente mit Galaktose induzierbarem HA-SNC1 zu den angegebenen Zeitpunkten 0-120 min oder 0-90 min **A.** Vergleich von Wildtyp Zellen mit $\Delta ddi1$ Zellen. **B.** Vergleich von Wildtyp Zellen mit Wildtypzellen die mit Pepstatin inkubiert wurden. **C.** Vergleich von Wildtypzellen mit leerem Vektor (p423) und mit konstitutiv überexprimiertem DDI1 (p423-ADH-DDI1).

SNC1 war in Wildtyp Zellen stabil, das Fehlen von DDI1 hatte keinen Einfluß auf dessen Stabilität (Abbildung 2-20A). Auch die Überexpression von DDI1 hatte keinen Einfluß (Abbildung 2-20C). Ein interessantes Ergebnis wurde durch die Zugabe von Pepstatin erzielt. SNC1 wurde durch Inhibierung der DDI1-Protease Funktion kurzlebiger (Abbildung 2-20B). Es ist möglich, durch die Bindung von Pepstatin an die Aspartyl-Protease-Domäne von DDI1 ein noch unbekanntes Substrat von DDI1 nicht mehr prozessiert werden kann, und dadurch der Regulationsschalter für Abbau aktiviert ist. Da jedoch die Anwesenheit des Zellgiftes Pepstatin zu einem verstärkten Ablauf der Exozytose führen könnte, und daher SNC1 als SNARE, das in endozytotischen Vesikelfusions-Prozessen beteiligt ist, dadurch vermehrt verbraucht und daher dem Abbau zugeführt wird, sollte das Experiment mit

einer Deletionsmutante ohne Aspartyl-Protease-Domäne durchgeführt werden.

3.2 Zwei-Hybrid Interaktion von DDI1 mit Ubiquitin und RSP5

Da DDI1 über eine UBA-Domäne verfügt, die als Ubiquitin-Binde-Domäne identifiziert wurde (siehe Einleitung Tabelle 1), sollte festgestellt werden, ob die UBA-Domäne von DDI1, für die Bindung an Ubiquitin allein verantwortlich war. Zusätzlich sollte getestet werden, ob RSP5, das als Ubiquitin-Ligase von SNC1 identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 1.6), mit DDI1 interagierte.

Dazu wurde mittels der Zwei-Hybrid-Methode die Interaktion von DDI1, und verschiedenen Verkürzungen von DDI1 mit Ubiquitin getestet. Mit derselben Methode wurde die Interaktion von DDI1 mit RSP5, mit den WW-Domänen von RSP5 und mit RSP5C777A, die keinen Thioster mit Ubiquitin ausbilden kann, getestet. RSP5C777A wurde durch Punktmutagenese von pGAD-RSP5 hergestellt, das zum Austausch des aktiven Cysteins durch ein Alanin führte. Für die Zwei-Hybrid-Interaktion mit Ubiquitin wurde ein Konstrukt verwendet, in dem zwei Ubiquitingene oder vier Ubiquitingene hintereinander kloniert wurden, das resultierende Protein enthielt zwei (2fach-Ubiquitin Fusionsprotein) oder vier Ubiquitinreste (4fach-Ubiquitin Fusionsprotein).

Volllängen DDI1 interagiert mit dem 4fach-Ubiquitin Fusionsprotein und dem 2fach-Ubiquitin Fusionsprotein (Abbildung 2-21-A-1a, 3a). Mit denselben Konstrukten in denen das C-terminale konjugative Glycin-Glycin Motiv am C-Terminus fehlte, wurde keine Interaktion (kein Wachstum) festgestellt (Abbildung 2-21-A-2a, 4a). Verkürztes DDI1 in dem die UBL-Domäne fehlte, verhielt sich wie Volllängen DDI1 (Abbildung 2-21-A-1b, 2b, 3b, 4b). Verkürztes DDI1, in dem die UBA-Domäne fehlte, interagiert mit dem 4fach-Ubiquitin Fusionsprotein (Abbildung 2-21-A-1c). Im Vergleich mit dem Wachstums des Volllängen DDI1 und DDI1 Δ ubl zusammen mit dem 4fach-Ubiquitin Konstrukt, war das Wachstum mit dem verkürzten DDI1 ohne die UBA-Domäne jedoch verzögert, die Kolonien wuchsen erst nach drei Tagen, bei allen anderen nach zwei Tagen, was durch verminderte Aktivierung des HIS-Reporters und daher verminderte Affinität zwischen DDI1 Δ uba und dem 4fach-Ubiquitin Fusionsprotein erklärbar ist. Verkürztes DDI1, in dem die UBL und die UBA-Domäne gleichzeitig fehlte, interagiert mit keinen der getesteten Konstrukte (Abbildung 2-21-A-1d, 2d, 3d, 4,d).

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Bindung von DDI1 an Ubiquitin zwei Faktoren maßgeblich waren: die Anzahl der Ubiquitinmoleküle und die Anwesenheit der beiden C-terminalen Glycine, die essentiell für die Konjugation sind. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Präferenz der Bindung an Ubiquitin, das an Substrate konjugiert ist, besteht. Diese Bindung an konjugierte Multiubiquitinketten wird durch die UBA-Domäne und zum Teil der UBL-Domäne von DDI1 vermittelt, wie die Untersuchung von verschiedenen Verkürzungen von DDI1 ergab.

Der Zwei-Hybrid Interaktions-assay von RSP5 und DDI1, führte zu folgenden Ergebnissen (Abbildung 2-21-B): Das Volllängen RSP5 interagiert mit dem Volllängen-DDI1, mit dem verkürzten DDI1 in dem die UBL-Domäne fehlte, und mit der UBA-Domäne von DDI1. Verkürztes DDI1 in dem die UBA-

Ergebnisse

Domäne fehlte, oder beide Domänen (UBA und UBL), konnten mit RSP5 nicht mehr interagieren. Um zu sehen, ob die Interaktion von RSP5 durch die WW-Domänen erfolgte, wurde die Interaktion mit den WW-Domänen von RSP5 getestet; DDI1 konnte mit diesem Konstrukt nicht mehr interagieren. Um zu testen, ob das C-terminale aktive Cystein, dass mit Ubiquitin einen Thioester bildet, benötigt wird, wurde das Volllängen-RSP5 Konstrukt verwendet, in dem das aktive Cystein durch ein Alanin ersetzt war. Mit diesem Konstrukt war die Interaktion von RSP5 und DDI1 aufgehoben.

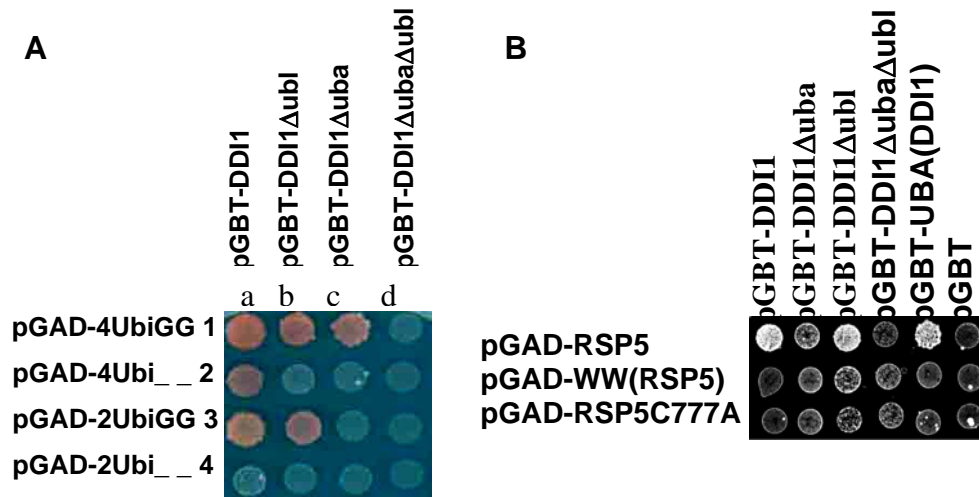


Abbildung 2-21: DDI1 kann über UBA-Domäne oder Ubiquitin an RSP5 binden. Vergleich von Two-hybrid Interaktionen von verschiedenen Verkürzungen von DDI1 **A.** mit 4fach und 2fach Ubiquitin Leserahmen-Fusionen in denen die beiden Glycine (GG) vorhanden sind oder fehlen (__). **B.** mit Volllängen RSP5, den WW-Domänen von RSP5 (WW(RSP5)) und mutiertes RSP5(RSP5C777A), dass keinen Thioester mit Ubiquitin mehr bilden kann.

Die Bindung von DDI1 an RSP5 ist strikt an die Anwesenheit der UBA-Domäne gekoppelt. Für die Bindung ist das aktive Cystein, dass den Thioester mit Ubiquitin bildet, ausschlaggebend. Mit großer Wahrscheinlichkeit bindet die UBA-Domäne indirekt über das im Thioester gebundene Ubiquitin. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die UBA-Domäne von DDI1 eine ebenso starke Affinität zum aktiven Zentrum von RSP5 besitzt wie zu freiem Ubiquitin.

3.3 UBA-Domänen von DDI1 und EDE1 binden an ubiquitylierte Substrate

Um die Zwei-Hybrid-Interaktion der UBA-Domänen mit Ubiquitin biochemisch zu bestätigen und näher zu charakterisieren, wurden die physikalische *in vivo* Interaktion der UBA-Domäne von DDI1 in Hefelysat untersucht. Als Vergleich für die Spezifität der Interaktionen diente die UBA-Domäne von EDE1, dass in

Ergebnisse

der Rezeptorvermittelten-Endozytose eine Funktion besitzt (Gagny et al. 2000).

Dazu wurde GST-UBA-Domänen aus DDI1 und EDE1 in *E. coli* gereinigt und für eine Affinitätssäule verwendet. Nach Inkubation mit Hefelysat erfolgte eine sequentielle Elution mit NaCl und SDS.

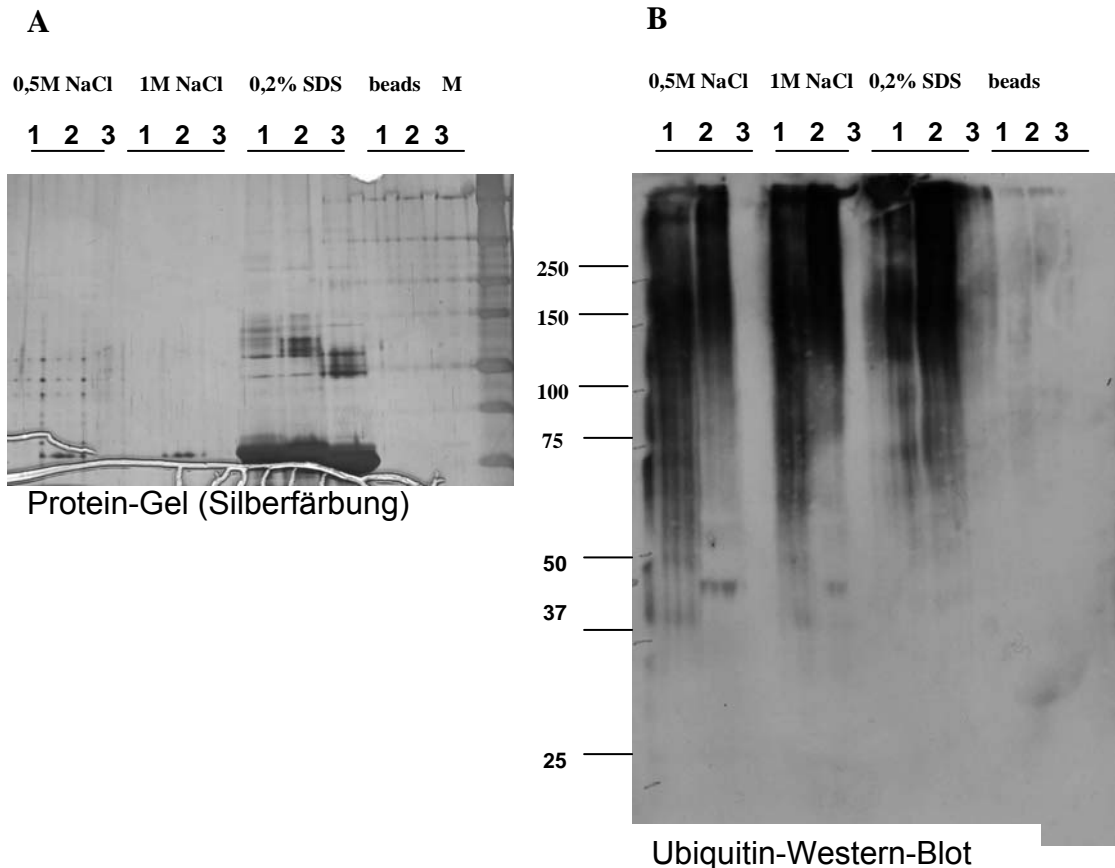


Abbildung 2-22: UBA-Domänen binden an Ubiquitin-konjugierte Substrate. Affinitätssäule mit GST-UBA(DDI1) (1), GST-UBA(EDE1)(2), GST(3) mit sequentieller Elution mit 0,5 M NaCl, 1 M NaCl und 0,2 % SDS **A**. Silberfärbung **B**. Western-Blot mit anti-Ubiquitin Antikörper

Mit 0,2 % SDS im Puffer wurde GST und die GST-Fusionsproteine eluiert (Abbildung 2-22A). Im Western-Blot zeigte sich, dass von der GST-UBA Fusionsprotein Säulen mit den Elutionspuffern ein spezifischer „Ubiquitinschmier“ von 50 kDa bis über 300 kDa eluiert wurde. Die Kontrolle mit GST zeigte keine Interaktionen mit Ubiquitin (Abbildung 2-22B).

Aus diesem Experiment kann man ablesen, dass UBA-Domänen ubiquitylierte Konjugate binden können. Mit hoher Wahrscheinlichkeit entscheidet der Grad der Ubiquitylierung und die Art der Ubiquitylierung der Substrate über die Bindung an die UBA-Domänen. Die hier eluierten Substrate könnten mono, multi- oder polyubiquityliert sein. In RAD23 befindet sich gleich wie in DDI1 eine konservierte N-terminale UBL-Domäne, die an das Proteasom binden kann (Elsasser et al. 2004). Es ist bisher noch nicht bekannt, ob auch die UBL-Domäne von DDI1 mit dem Proteasom interagiert.

Diskussion

Der intrazelluläre Transport von Proteinen und Membranen erfolgt in Form von Vesikeln. Für das Finden, Erkennen und Fusionieren von Transport-Vesikeln mit ihrer Zielmembran sind SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) von essentieller Bedeutung. Ein bekanntes Beispiel für die Fusion von Vesikel mit einer Membran ist die Vesikelfusion mit der Zielmembran in den Synapsen von dendritischen Zellen. Mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel verschmelzen mit der präsynaptischen Membran um die Neurotransmitter in den postsynaptischen Spalt zu entlassen, wo die Neurotransmitter als Signal für die angrenzende Nervenzelle dienen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die v-SNAREs SNC1 und SNC2, homologe Proteine der Synaptobrevine in höheren Eukaryonten (Abbildung 3-1), durch Ubiquitin modifiziert werden können. Die Ubiquitylierung erfolgt an mehreren Stellen im Protein. Der Verlust einer dieser Modifikationsstellen führt zu einer teilweisen Veränderung der Lokalisation, von der Plasmamembran zu einer Membran, die möglicherweise der Vakuolenmembran entspricht. In diesem Fall scheint die Ubiquitylierung ein lysosomales Signal zu sein, dass für die Lokalisation in das Lumen der Vakuole benötigt wird. Der Unterschied zu den bekannten ubiquitylierten Membranrezeptoren (STE2, STE6) und Permeasen (GAP1, FUR4), die ebenfalls über die Vakuole reguliert werden, besteht darin, dass eine der Ubiquitylierungsstellen sich in einer funktionellen Domäne, den Coiled-Coils befindet. Die mögliche zweite Modifikationsstelle ist nicht bekannt. Das bekannte SNC1/SNC2 SNARE-Bindeprotein DDI1 bindet an Ubiquitin. Von besonderer Bedeutung ist, dass die Ubiquitin-Modifikation von SNC1/SNC2 nicht zum üblichen Abbau des Substrates über das Proteasom führt. Somit konnte ein weiteres Beispiel charakterisiert werden, dass die Komplexität der Funktionen von Ubiquitin aufzeigt.

1. SNAREs werden ubiquityliert

In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden homologen v-SNAREs SNC1 und SNC2 als Substrate für Ubiquitin-Modifikationen identifiziert werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2-1). SNC1 und SNC2 verfügen über sechs konservierte Lysine. Durch systematische Mutagenese der konservierten Lysine konnte das Lysin-63 als eine der Ubiquitylierungsstellen von SNC1 und SNC2 identifiziert werden (Abbildung 2-4A). Nur in *rsp5-1* und *rsp5-2* Stämmen konnte unter restriktiven Bedingungen eine nicht-ubiquitylierte Form von SNC1 identifiziert werden (Abbildung 2-6). Da die Lysin-63 Mutation einen deutlichen Phänotyp zeigt (siehe Diskussion, Kapitel 3), liegt der Schluß nahe, dass die verbleibende Monoubiquitylierung eine von Lysin-63 getrennte Funktion besitzt. Die Frage wo sich diese mögliche zweite Ubiquitylierungsstelle befindet, könnte auch eine Antwort auf die Funktion dieser Ubiquitylierungsstelle sein. Auffällig ist, dass SNC1/SNC2 über eine Anhäufung von Lysinen (K83/K88/K91+K93 in SNC1) in der Region zwischen der Transmembran-Domäne und der Coiled-Coil-Domäne besitzen. Diese basischen Aminosäuren die als eine basische Interaktions-Plattform mit der

Phospholipidgruppe der Phospholipide in der Membran dienen, könnten durch Ubiquitylierung eine Konformationsänderung erfahren (siehe Diskussion, Abschnitt 4).

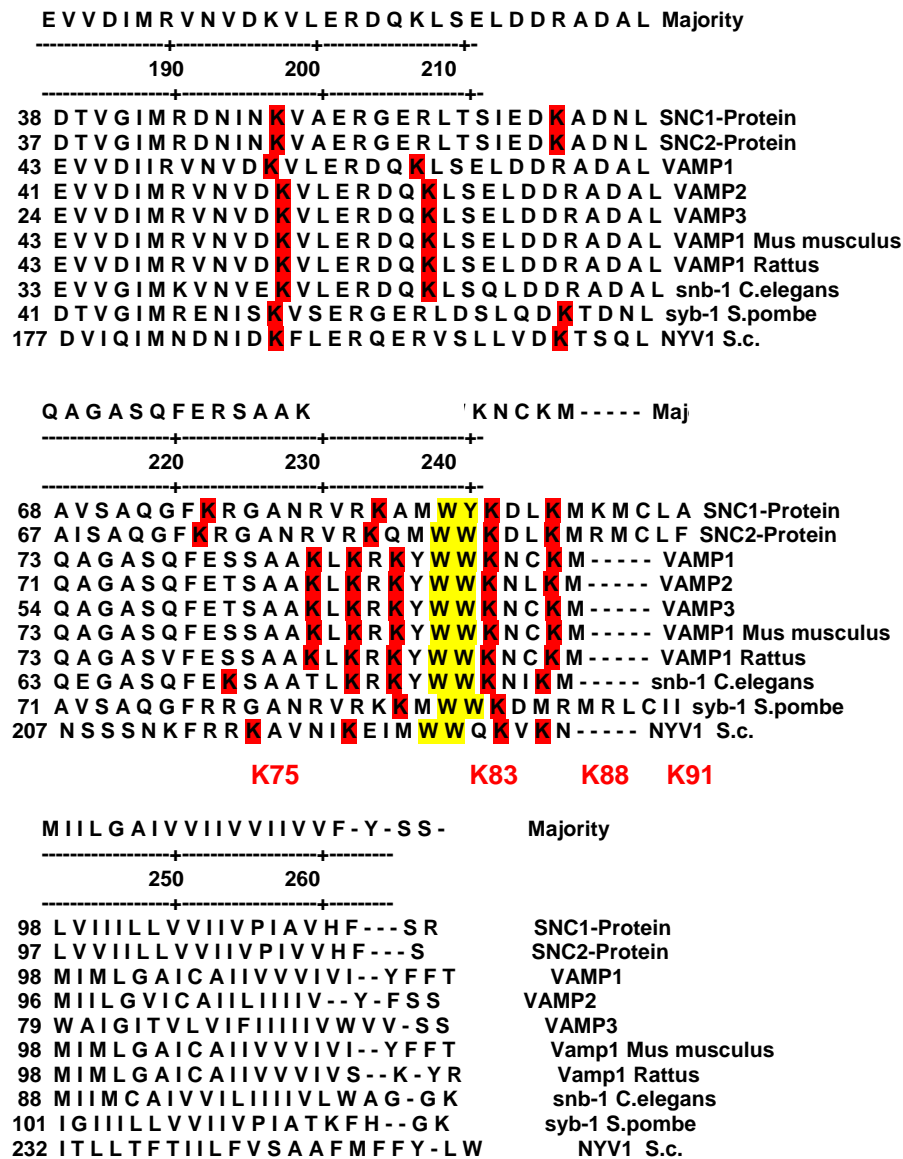


Abbildung 3-1: Sequenzvergleich SNC1/SNC2 mit VAMP in höheren Eukaryonten und anderen Organismen. SNC1 und SNC2 besitzen sechs konservierte Lysininstellen: K63, K75, K83, K88 und K91. Die Lysine 48, 88 und 91 sind auch in VAMP konserviert.

Während dieser Arbeiten wurden weitere Beispiele der Ubiquitylierung von SNAREs bekannt. Mit massenspektroskopischen Methoden (LC/LC-MS/MS) wurden neue Ubiquitin-Konjugate identifiziert, hier konnten zwei Synaptobrevine und ein Syntaxin identifiziert werden, die durch Ubiquitin modifiziert waren (Hitchcock et al. 2003): YKT6, ein Synaptobrevin, essentiell für den Transport vom ER zum Golgi; SSO2, ein Syntaxin (t-SNARE) Homologes, in den Vesikel-Transport vom Golgi zur Plasmamembran involviert, und im *trans*-SNARE Komplex zusammen mit SNC1/SNC2 vorkommend; und VTI1, ein Synaptobrevin, für den internen *cis*-Golgi-Transport benötigt, und am direkten Transport vom Golgi zu den MVBs

beteiligt. In einem weiteren Experiment, bei dem an einer Affinitätssäule ubiquitin-konjugierte Substrate spezifisch gebunden wurden, und durch Massenspektrometrie bestimmt wurden, konnte SNC1 und SNC2 als ubiquityliertes Substrat identifiziert werden. Auch die hier charakterisierte Ubiquitinierungsstelle am Lysin-63 wurde gefunden (Peng et al. 2003). Mit der von Peng und Kollegen benutzten Methode sollten hauptsächlich ubiquitylierte integrale Membranproteine gefunden werden, die über die Vakuole abgebaut werden. Die hier postulierte zusätzliche Ubiquitylierungsstelle wurde nicht gefunden. Interessant in diesem Experiment war, dass von den 72 identifizierten Ubiquitinsubstraten 33 % mehr als eine Ubiquitylierungsstelle besaßen. Diese Ergebnisse berücksichtigend, kann nun postuliert werden, dass es sich bei der Modifikation von SNC1 und SNC2 um eine generelle Art der Modifikation von SNAREs handelt. Hinsichtlich der Erforschung der Funktion der Ubiquitylierung von SNAREs, in Bezug auf Funktion liegen noch keine Publikationen vor.

Wie unterscheidet sich die Art der Ubiquitylierung der SNAREs von der der Plasmamembranrezeptoren? Im Falle der SNAREs handelt es sich um kleine einmal die Membran durchspannende Proteine. Die Besonderheit der Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 liegt darin, dass diese in einer für die Membranfusion essentiellen Domäne, an den Coiled-Coils stattfindet. Im Fall von Plasmamembranrezeptoren erfolgt die Ubiquitylierung an mehreren Lysinen in den ins Cytosol ragenden, unstrukturierten Schleifen (Peng et al. 2003), die bislang noch mit keiner spezifischen Funktion in Verbindung gebracht wurden. Es ist möglich, dass die Ubiquitylierung in einer funktionellen Domäne zur Inaktivierung der Funktion führt.

Wie die Ubiquitylierung von Membranrezeptoren und Permeasen erfolgt die Ligation von Ubiquitin an SNC1 durch RSP5 (Abbildung 2-6). Es ist wahrscheinlich, dass auch SNC2 RSP5-abhängig ubiquityliert wird. Auch für die Membranproteine FUR4, STE6 und STE2 ist gezeigt worden, dass die RSP5-Ligaseaktivität die Ubiquitylierung beeinflusst.

Es gibt auch aktuelle Beispiele von SNAREs, bei denen die Ubiquitylierung ein Signal für proteasomalen Abbau zu sein scheint. UFE1, ein Syntaxin Homologes, das für die homotypische ER-Membranfusion essentiell ist, scheint ein Substrat des ERAD-Weges zu sein. Die Stabilisierung in den ERAD-Mutanten ist aber eher gering im Vergleich zu typischen ERAD-Substraten (unpublizierte Daten von Sigurd Braun). Auch ein Beispiel in höheren Eukaryonten ist bekannt. Die Autoren konnten die Ubiquitylierung von Syntaxin 1, dass für den Neurotransmittertransport an der Synapse essentiell ist, zeigen. Die Ubiquitylierung erfolgt durch die E3-Ligase Staring zusammen als trimere Komplex mit dem E2 UbcH8. Die Überexpression des Proteins Staring in HeLa Zellen bewirkte die Reduzierung der Halbwertszeit von 19.6 Stunden auf 8.6 Stunden. Die Verkürzung der Halbwertszeit führten die Autoren auf die Einwirkung des Proteasoms zurück, da der Level von Syntaxin 1 in Zellen die mit Proteasominhibitor (MG132) behandelt wurden, im Vergleich zu Wildtypzellen erhöht war (Chin et al. 2002). Wenn man die Ubiquitylierung von Syntaxin 1 mit SNC1/SNC2 vergleicht, so fällt auf, dass im Falle von Syntaxin die Ubiquitylierungsbanden als Multiubiquitin-Schmier erscheinen, während in SNC1/SNC2 die Ubiquitylierung mit 3 bis maximal 4 Ubiquitinmolekülen

erfolgt. Dass ein geringer Teil der SNAREs über das Proteasom degradiert wird, kann auch für SNC1/SNC2 nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Bedeutung für die Regulation von SNAREs scheint jedoch vernachlässigbar gering.

2. UBA-Domänen erkennen ubiquitylierte Substrate

Die beiden SNAREs SNC1 und SNC2 interagieren mit DDI1. DDI1 („DNA-damage-inducible“) oder VSM1(v-SNARE-Master) genannt, wurden in einem Zwei-Hybrid-Screen, bei dem nach neuen direkten Interaktionspartnern von SNC2 gesucht wurde, gefunden und durch Co-Immunpräzipitation bestätigt (Lustgarten et al. 1999). Interessant sind die Domänen von DDI1. Die UBL-Domäne, N-terminal; eine Aspartyl-Protease-Domäne in der Mitte, und die UBA-Domäne (Ubiquitin-associated), C-terminal. Die genaue Funktion von DDI1 ist nicht bekannt.

Die genetische Beziehung zwischen SNC1 und DDI1 konnte reproduziert werden (Abbildung 2-7). Der temperatursensitive Phänotyp in *sec9-4* Zellen, die durch Überexpression von SNC1 oder SNC2 gerettet werden kann, wurde durch gleichzeitige Überexpression von DDI1 supprimiert (siehe auch Lustgarten et al. 1999). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass DDI1 als SNARE-Master wirken könnte. SNARE-Master sind Regulatoren die spezifisch mit v- oder t-SNAREs interagieren, und als Folge davon den Eintritt des SNAREs in den *trans*-SNARE Komplex verhindern.

Die genetische Beziehung *sec9-4*/SNC1/DDI1 läßt die Vermutung zu, dass der Phänotyp durch Austitrierung von SNC1/SNC2 aus dem t-SNARE Komplex zustande kommt. Diese Austitrierung kann durch Bindung von DDI1, durch Abbau von SNC1/SNC2, oder durch Inhibierung der Coiled-Coil-Domäne von SNC1/SNC2 geschehen. Die Konsequenz ist in jedem Fall, dass durch die Einwirkung von DDI1 der Eintritt von SNC1/SNC2 in den *trans*-SNARE Komplex verhindert wird. Genaue Kartierung der Interaktion von DDI1 und SNC1/SNC2 könnten hier Aufschluß geben. Es ist vorstellbar, dass die Interaktion durch die UBA-Domäne von DDI1 an das in SNC1 konjugierte Ubiquitin erfolgt. Eine genaue Bestimmung des Einflusses von DDI1 auf die Stabilität von SNC1/SNC2, könnte durch ein „Pulse-Chase“ Experiment erzielt werden. Mit dieser Methode wird das zu beobachtende Protein nicht überexprimiert sondern vom endogenen Promotor aus exprimiert. Somit wird unter physiologischen Bedingungen die Stabilität von SNC1/SNC2 bestimmt. Eine zusätzliche Verbesserung des Experiments ergäbe sich durch die induzierbare Expression von DDI1, im Gegensatz zu der hier angewendeten konstitutiven Expression von DDI1. Aufgrund der permanenten Überexpression von DDI1 in Hefezellen, ist eine nicht erwünschte Mutagenese im Hefe-Genom möglich.

In diesem Zusammenhang ist auch die Aspartyl-Protease-Domäne von DDI1 interessant. Ein Hinweis auf proteolytische Zugänglichkeit für endo-proteolytische Spaltung von SNC1 bildet die Anwesenheit von verkürztem SNC1 im Verhältnis 1:10 zum Vollängenprotein im steady state von Zellen, die vom endogenen Promotor aus exprimiert wurden (Abbildung 2-18). Die Membranfraktionierung von Gesamtextrakt zeigten, dass die kurze Version, die die Coiled-Coil-Domäne ohne die Transmembran-Domäne darstellt, sich

in der Vesikelfraktion befindet, während das Volllängen Protein in der Membranfraktion lokalisiert (Abb. 2-18). Denkbar wäre, dass die proteolytische Domäne von DDI1 unter bestimmten Bedingungen aktiviert wird.

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass die UIM-Domäne, die strukturell mit der UBA-Domäne verwandt ist, ausreicht, um ein Protein an das es fusioniert ist zu ubiquitinieren. So wurde das Fusionsprotein UIM-GST ubiquityliert, GST nicht (Oldham et al. 2002). DDI1 besitzt am Lysin-257 eine Ubiquitylierungsstelle (Hitchcock et al. 2003). Ein interessantes Detail ist, dass diese Proteinstelle exakt in der Aspartyl-Protease-Domäne liegt. Es ist möglich, dass durch Ubiquitylierung an dieser Stelle, die Aspartyl-Protease Funktion reguliert wird. Das Signal für die Ubiquitylierung könnte von der DDI1 internen UBA-Domäne ausgehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hinsichtlich der Spezifität der Bindung der UBA-Domäne an Ubiquitin-Konjugate im Vergleich mit einer anderen UBA-Domäne (EDE1) kein Unterschied besteht (Abbildung 2-22). Auch im Zwei-Hybrid Test erfolgt bei beiden UBA-Domänen die Bindung präferenziell an konjugiertes Ubiquitin (Abbildung 2-21A). Die Interaktion der UBA-Domäne mit Ubiquitin konnte auch in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden (Bertolaet et al. 2001; Chen et al. 2001). Die genaue Funktion der UBA-Domänen ist noch unbekannt.

Die 2-Hybrid Interaktion von DDI1 und EDE1 zu RSP5 erfolgt allein über die UBA-Domäne. Diese Interaktion ist von der Anwesenheit des aktiven Cystein in RSP5 abhängig (Abbildung 2-21B). Die Tatsache, dass die UBA-Domäne in diesem Experiment eine Expression des HIS-Reportergens bewirken konnte, kann nicht als unspezifische Interaktion abgetan werden. Im Kontext mit der RSP5 abhängigen Ubiquitylierung von SNC1 und der physikalischen Interaktion von DDI1 und SNC1, ist eine *in vivo* Affinität plausibel. Es ist möglich, dass die UBA-Domäne selbst in das aktive Zentrum von RSP5 bindet. Damit würde die UBA-Domäne mit Ubiquitin um die Bindung an RSP konkurrieren. Oder in Anbetracht, dass UBA-Domänen präferenziell an das Ubiquitin ubiquitylierter Substrate binden, die Bindung über das in RSP5 über den Thioester gebundene Ubiquitin erfolgt. In beiden Fällen hätte die Bindung von DDI1 eine Inhibierung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität zur Folge. In höheren Eukaryonten kann die HECT-E3 Ligase Nedd4, das das Homologe von RSP5 darstellt, das UIM-Domänen enthaltende EPS15 monoubiquitinieren. Diese Monoubiquitylierung ist strikt abhängig von der Anwesenheit der UIM-Domäne, einer Ubiquitin-Binde-Domäne, die der UBA-Domäne strukturell sehr ähnlich ist (Polo et al. 2002). Es ist möglich, dass die Ubiquitin-bindende Domäne -UBA, UIM, CUE- dazu dient, Ubiquitin-HECT E3 Thioester-Intermediate zu rekrutieren, und der spezifischen Ubiquitin-Ligase zuzuführen.

3. Die Bedeutung der SNARE-Ubiquitylierung für die lysosomale Erkennung

Die Möglichkeiten der Regulation des Proteintransports durch Ubiquitin-Signale -Monoubiquitylierung, Multiubiquitylierung durch ubiquitininternes K63- sind vielfältig. In einer zunehmenden Anzahl von Publikationen wird der

ubiquitinabhängige Vesikeltransport beschrieben (Abbildung 3-2). So wird Ubiquitin für die Internalisierung an der Plasmamembran, die Regulation der endozytotischen Maschinerie, Sortierung am TGN und der Internalisierung in MVBs benötigt.

GFP-SNC1-K63R lokalisiert nicht wie in Wildtypzellen unter anderem im Lumen der Vakuole, sondern in der Membran der Vakuole (Abbildung 2-16). Die Lokalisierung an der Plasmamembran scheint durch die Mutation jedoch nicht beeinträchtigt zu sein. Lysin-63 scheint damit für den Eintritt in das Lumen der Vakuole benötigt zu werden.

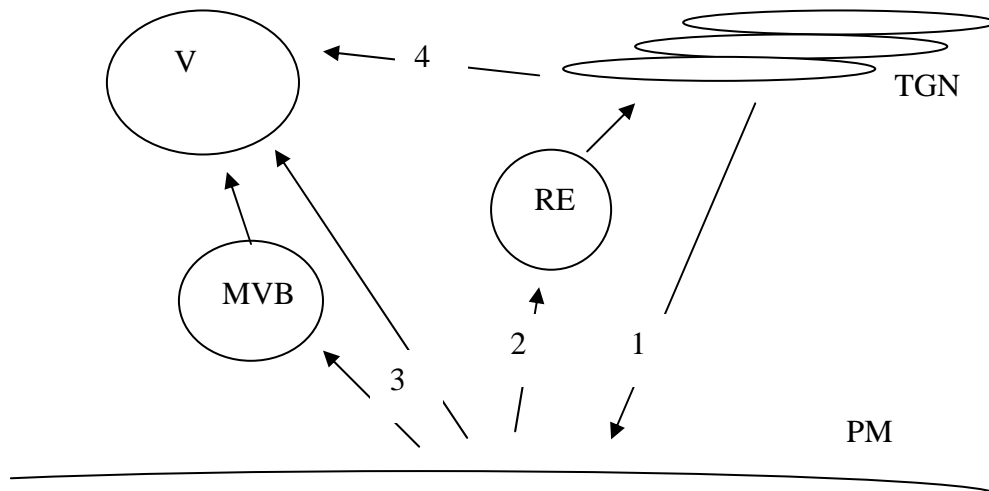


Abbildung 3-2: Ubiquitinabhängiger Vesikeltransport. 1. Sortierung vom *trans*-Golgi Netzwerk zur Plasmamembran. 2. Recycling-Endosomen von der Plasmamembran zum Golgi 3. Endozytose (über Multivesikuläre Teilchen) in die Vakuole. 4. Sortierung vom *trans*-Golgi Netzwerk zur Vakuole.

Membranrezeptoren und Permeasen aber auch kleinere Proteine wie CPS (Carboxypeptidase S), die das Lumen der Vakuole erreichen sollen, werden in der Regel über den MVB-Weg erkannt und transportiert (Katzmann et al. 2002). SNC1 scheint von dieser Regel abzuweichen, da die Lokalisation von GFP-SNC1 in *vps4*-Mutanten, VPS4 ist eine AAA-ATPase, die für die Sortierung in MVBs benötigt wird, in keiner Weise beeinträchtigt ist (Lewis et al. 2000). Hinzu kommt nun die Mißlokalisierung der GFP-SNC1-K63R-Mutante in die Vakuolen-Membran. Zielproteine die über die ubiquitinabhängige MVB-Maschinerie in die Vakuole sortiert werden, müßten, durch entfernen des Ubiquitinsignals in den MVBs akkumulieren. In GFP-SNC1-K63R ist dies nicht der Fall. Somit konnte der Hinweis, dass SNC1 MVB-unabhängig transportiert wird, bestätigt werden.

Ein MVB unabhängiger Transportweg zu Vakuole wurde bisher noch nicht charakterisiert. In einer neu charakterisierten *rsp5*-Mutante, *rsp5-326*, wurde ein neuer Hinweis auf einen MVB-unabhängigen Weg gefunden. Unter permissiven Bedingungen ist diese Mutante defekt für die Ubiquitylierung von CPS, nicht aber für die STE2 Ubiquitylierung. Da unter restriktiven Bedingungen CPS in die Vakuolen-Membran lokalisiert, also nicht mehr korrekt in das Lumen in der Vakuole, interpretieren die Autoren (Katzmann et al. 2004), dass RSP5 direkt für das Sortierung in MVB Vesikel verantwortlich

ist. Interessant ist jedoch, dass in *rsp5-326* das charakteristische Klasse E Kompartiment, das durch Inhibierung des MVB-Weges entsteht, gänzlich fehlt (Katzmann et al. 2004). Es scheint als würde die Mutation dazu führen, dass die gesamte MVB Maschinerie zusammenbricht. GFP-CPS akkumuliert nicht wie in den MVB Mutanten im Klasse E Kompartiment sondern in der Vakuolenmembran, das würde heißen, dass in manchen Fällen der MVB-Weg umgangen werden kann.

Die Ubiquitylierung von SNC1 kann auch ein Signal für Recycling sein, bekannterweise wird SNC1 recyclet. Mit Recycling ist der Rücktransport von Protein an der Plasmamembran durch Recycling-Vesikel an Post-Golgi Membranen definiert. *tlg1*, *tlg2* und *rcy1* Mutanten sind defekt im Recycling-Weg (Wiederkehr et al. 2000). VPS Proteine der Klasse C sind an diesem Recycling Transport beteiligt (Bugnicourt et al. 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SNC1 in *rsp5-1* Zellen in punktförmigen Kompartimenten in Vesikeln in der Nähe der Plasmamembran akkumulieren. Diese Lokalisation entspricht einer ähnlichen Lokalisation wie SNC1 in *rcy1* besitzt (Galan et al. 2001). So lässt sich auch die Lokalisation von SNC1-K63R in der Vakuolenmembran dadurch erklären, dass durch Fehlen des Ubiquitin-Signals für die Recycling-Maschinerie, eine Umleitung von der Plasmamembran zur Vakuole geschieht. Die K63R Mutation kann also für Recycling als auch für Transport in das Lumen der Vakuole genutzt werden beziehungsweise von Bedeutung sein. Die Entscheidung welcher Weg eingeschlagen wird könnte durch UBA-Domänen Proteine reguliert werden (siehe Absatz unten). Die Tatsache, dass auch andere SNAREs ubiquityliert werden, bedeutet möglicherweise, dass auch diese über den lysosomalen Weg entsorgt beziehungsweise reguliert werden.

SNC1 wurde im Komplex mit den im *trans*-Golgi-Netzwerk vorhandenen t-SNAREs TLG1/TLG2 gefunden (Gurunathan et al. 2000). Eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit könnte daher die Sortierung von SNC1/SNC2 vom Golgi zur Vakuole sein. Dieser Weg konnte schon für die Permease GAP1 beschrieben werden. Dies setzte die Ubiquitylierung von GAP1 voraus (Helliwell et al. 2001). GGA Proteine, die bei der Erkennung und Verpackung von Proteinen in Clathrin-Vesikel am TGN maßgeblich beteiligt sind, sortieren GAP1 in Abhängigkeit von dessen Ubiquitylierung (Scott et al. 2004). Es ist möglich, dass die ubiquitylierten SNAREs SNC1/SNC2 auf gleiche Weise durch GGA-Proteine sortiert werden.

4. Die Bedeutung der SNARE-Ubiquitylierung für die Fusion von Membranen

Es stellt sich die Frage, wann die SNARE-Ubiquitylierung erfolgt, vor oder nach erfolgter Vesikelfusion?

Die *sec9-4* Mutation bewirkt dass SEC9 nicht mehr in den *trans*-SNARE Komplex lokalisieren kann. Der so destabilisierte Komplex kann durch Überexpression von SNC1/SNC2 wieder stabilisiert werden. Kann ein ubiquityliertes SNARE einen Komplex mit dem t-SNARE-Partner eingehen, oder wird Ubiquitin für die Bildung des Komplexes sogar benötigt? Die genetischen Daten im *sec9-4* Stamm zeigen, dass Wildtyp-SNC in gleicher Weise wie Lysin-63 mutiertes SNC den *sec9-4* Phänotyp retten können

(Abbildung 2-7). So scheint Ubiquitin für die Bildung des *trans*-SNARE Komplexes keine Bedeutung zu haben.

Die Akkumulation von ubiquityliertem SNC1 an der Plasmamembran in *end3* und *end4* zeigt, dass die Ubiquitylierung wahrscheinlich nach der Fusion stattfindet. Zu einem Zeitpunkt da der *trans*-SNARE Komplex aufgelöst ist, und die SNAREs sich in der *cis*-Konfiguration an der Plasmamembran befinden.

In *rsp5-1* und *rsp5-2* Mutanten erfolgt keine Ubiquitylierung. In den selben Mutanten erfolgt die Lokalisation von GFP-SNC1 nicht mehr an der Plasmamembran sondern in vesikulären Akkumulationen an der Plasmamembran (Abbildung 2-15). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass durch das Fehlen von Ubiquitin das Signal fehlt das von NSF erkannt werden könnte. Die SNAREs aggregieren und können nicht weiter für den Recycling Weg zu Verfügung stehen.

Kann die Ubiquitylierung eine Konformationsänderung der SNAREs hervorrufen? In EPR und Fluoreszenz „Quenching“ Experimenten konnte die erste Strukturinformation von einem Vollängen SNARE geliefert werden, dass sich in seiner Membrenumgebung befindet (Kweon et al. 2003). In Vamp 2, das Eukaryonten-Homologe von SNC2, ist der Großteil des Proteins hoch flexibel, mit Ausnahme von 10 Aminosäureresten des C-terminalen Teils des SNARE-Motivs. Diese bilden eine kurze α -Helix, die in einem 33° Winkel in der Membran eingebettet liegt. Weiters wird gezeigt, dass die beiden konservierten Tryptophanreste unter den Phosphat-Kopfgruppen der Phospholipide liegt (Abbildung 3-3). Die wohl interessanteste Entdeckung ist, dass dieses Protein keineswegs mit löslichem Syntaxin und SNAP-25 bindet (Kweon et al. 2003), wie es nach der SNARE-Hypothese geschehen müsste (Rothman 1994). Nur die Mutante, in der die Tryptophanreste zu Serin mutiert sind, können einen Komplex mit Syntaxin und SNAP-25 eingehen. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass der Verlust der Tryptophanreste zu einem Verlust des Kontakts der im 33° Winkel stehenden α -Helix mit der Membran führen könnte. *In vivo* könnte diese Konformationsänderung durch SNARE-Interaktionsproteine herbeigeführt werden, zum Beispiel SM Proteine. Die Tatsache, dass SM Proteine für die meisten intrazellulären Membranfusions-Prozesse strikt erforderlich sind (Rizo et al. 2002), unterstützt die Theorie, dass zusätzlich Regulationsproteine die SNARE-Proteine regulieren.

Diese Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die SNARE-Hypothese. Es wird immer mehr evident, dass nicht die minimale Maschinerie von SNAREs, α -SNAP und NSF für die Fusion ausreichend ist, sondern zusätzliche Regulationsproteine benötigt werden. Beispielsweise führt der Verlust des SM-Proteins Munc 18 in Mäusen zu einem totalen Block der Neurotransmitterausschüttung (Verhage et al. 2000). Der Verlust von Vamp 1 hingegen wirkt sich nicht so stark auf die Neurotransmitterausschüttung aus (Schoch et al. 2001).

Es ist vorstellbar dass die Regulation dieser kurzen α -Helix über Ubiquitylierung stattfindet. Die Untersuchung der Ubiquitylierung und die Involvierung in Membranfusions-Prozesse in höheren Eukaryoten in Vamp 1 oder Vamp 2 wäre aufschlußreich.

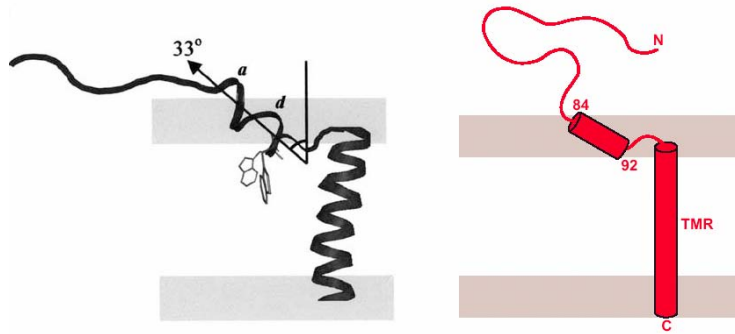


Abbildung 3-3: Topologisches Modell von in der Membran eingebettetes Vamp 2 mithilfe von EPR-Spektroskopie erstellt (Kweon et al. 2003). Zwei α -Helicale Umdrehungen (Aminosäuren 85-92), N-terminal von der Transmembran-Domäne, stehen im Winkel von 33° zur Membran. Zwei Tryptophanreste sind für die Membranassoziation essentiell. Die a und d Position des coiled coils sind eingezeichnet. TMR: Transmembran-Region.

Ein allgemeingültiges Modell läßt sich aus den Ergebnissen nur sehr vorsichtig ableiten (Abbildung 3-4). Nach der Fusion des v-SNAREs SNC1/SNC2 mit SSO1/SSO2 an der Plasmamembran, mit Beteiligung von SEC9, SEC17 und SEC18 erfolgt die erste Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 durch die Ubiquitin-Ligase RSP5. Die Ubiquitylierung kann noch im *trans*-SNARE Komplex erfolgen oder zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die Fusion schon stattgefunden hat und SNC1 als *cis*-SNARE Komplex in der Plasmamembran vorliegt. In beiden Fällen könnte Ubiquitin für die Auflösung des SNARE Komplexes verantwortlich sein. Es gibt zwei nicht exklusive Szenarien die nach Auflösung des Komplexes vorstellbar sind. Ein Teil der SNAREs wird recycelt und steht für eine erneute Runde der Membran Fusion zur Verfügung; ein zweiter Teil wird eliminiert, dies kann teilweise durch das Proteasom oder vakuoläre Proteasen erfolgen. Für das Recycling wird SNC1/SNC2 über Recycling-Vesikel, die durch TLG1, TLG2 und RCY1 charakterisiert sind, wieder an den post-Golgi transportiert, und die SNAREs stehen erneut für eine Runde der Fusion zur Verfügung. Für die Erkennung durch den Recycling-Weg könnte die Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 entscheidend sein. Für die Eliminierung des SNAREs von der Plasmamembran, erfolgt die Aktivierung des gut charakterisierten ubiquitinabhängigen Invagination in endozytotische Vesikel, um am Ende in der Vakuole durch vakuoläre Proteasen abgebaut zu werden. Auch hier könnte der Ubiquitylierungs-Grad von SNC1/SNC2 das entscheidende Signal für den Transport zur Vakuole geben.

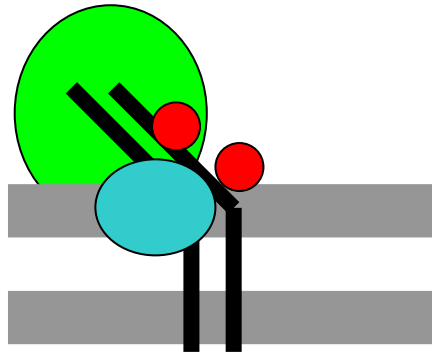


Abbildung 3-4: Zusammenfassung der an der Plasmamembran und in dieser Arbeit beteiligten Proteine: SNC1/SNC2 (λ), RSP5 (λ), DDI1 (λ) Ubiquitin (λ). Nach Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran liegen die SNAREs SNC1/SNC2 als Dimer in der *cis*-Konfiguration vor. Die Ubiquitylierung von SNC1 erfolgt an zwei unterschiedlichen Lysinresten durch RSP5. Die Disassemblierung des *cis*-SNARE-Komplexes erfolgt durch SEC18, das Ubiquitin binden kann. DDI1 interagiert mit SNC1/SNC2 und über die UBA-Domäne mit RSP5.

Die Rolle für DDI1 ist noch nicht bekannt. Es ist möglich, dass DDI1 RSP5 an die Plasmamembran rekrutiert, und dadurch die Ubiquitylierung von SNC1/SNC2 reguliert wird. DDI1 könnte durch seine interne AP-Domäne das Abschneiden der Transmembran-Domäne von SNC1/SNC2 bewirken, und damit zur Auflösung des *trans*-SNARE Komplexes beitragen. Eine allgemeingültige Funktion für DDI1 wird favorisiert, da DDI1 auch an andere SNAREs *in vivo* bindet (TLG1, TLG2, VTI1 und VAM3) (Marash et al. 2003).

Es scheint als gebe es für die SNARE-Assemblierung ein dichtes Netz an Regulationmöglichkeiten, um Membranproliferation und Sekretion geordnet ablaufen lassen zu können. Die Regulation durch das Protein selbst (Konformationsänderungen, Modifikationen durch Palmoylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung). Die Regulation durch SNARE-Bindeproteine (SM-Proteine, DDI1). Die Regulation durch Recycling (RCY1, VPS Proteine) und die Regulation durch Abbau in der Vakuole. Ubiquitin kann wie der Name schon sagt bekanntermaßen überall diese Regulationsprozesse beeinflussen. Die Identifizierung der SNAREs als Substrate für Ubiquitin und die hier identifizierte Bedeutung für die Regulation durch die Vakuole, stellen nur die Spitze des Eisberges für die Bedeutung von Ubiquitin dar.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Fluka, Kodak, Merck, Promega, Roth, Riedel de Haen, Serva und Sigma verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Roche, MBI, Fermentas,

New England Biolabs und Pharmacia bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham und Hartmann Analytic. In nahezu allen der unten beschriebenen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

1.2 Computer-Hardware und Software

Datenbankrecherchen wurden unter anderem mit Hilfe folgender Internetdienste durchgeführt: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>). Für Sequenzanalysen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Röntgenfilme und Gele wurden mit einem AGFA-Scanner (Duoscan T1200) oder mit einer CCD-Kamera und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Graphiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Excel:Mac oder Word:mac erstellt. Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Word:mac und Endnote 7.0.0 auf einem Apple Macintosh G3 Computer.

1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden für Immunoblots (IB) oder Immunpräzipitationen (IP) verwendet. Es waren entweder polyklonale Antikörper aus dem Hasen (rb) oder monoklonale Antikörper aus der Maus (mo). Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: rb anti-myc (Santa Cruz Biotechnology; IB); mo anti-myc, 9E10 (Santa Cruz Biotechnology; IB); mo anti-HA (Santa Cruz Biotechnology IB, IP); mo anti-DPM1 (Molecular Probes; IB); mo anti-His (Dianova; IB); rb anti-GST (Oncogene; IB). Sekundäre Antikörper waren entweder mit Peroxidase aus Meerrettich oder mit dem Fluorophor Alexa546 markiert und wurden von Dianova bzw. von Molecular Probes bezogen.

1.4 *Escherichia coli* Stämme

Für die meisten Arbeiten wurden die *E.coli*-Stämme *TG1* oder *XL1-Blue* verwendet. Expression von Proteinen erfolgte in *BL21 (DE3) pRIL*-Bakterien.

1.5 *E.coli* Medien

Den angegebenen Medien wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin, 200 µg/ml; Kanamycin, 30 µg/ml; Tetracyclin, 25 µg/ml; Chloramphenicol, 34 µg/ml.

1.6 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DF5 (YWO2)	Mata <i>his3Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	(Finley et al. 1987)
<i>sec17-1</i>	Mata <i>sec17-1^{ts} his3Δ200 leu2-3 2-112 trp1-1 ura3-52</i> entstanden durch Kreuzung von <i>sec17-1</i> (Novick et al. 1981) mit DF5	diese Arbeit
<i>sec18-1</i>	Mata <i>sec18-1^{ts} his3Δ200 leu2-3 2-112 trp1-1 ura3-52</i> entstanden durch Kreuzung von <i>sec18-1</i> (Thomas Sommer / Stammsammlung) mit DF5	diese Arbeit
<i>sed5-1</i>	Mata <i>sed5-1^{ts} trp1-1 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Chris Barlowe (Cao et al. 2000)
<i>sec9-4</i>	Mata <i>sec9-4^{ts} his3Δ200 leu2-3 2-112 trp1-1 ura3-52</i> entstanden durch Kreuzung von <i>sec9-4</i> (Brennwald, Kearns et al. 1994) mit DF5	diese Arbeit
<i>rsp5-1</i>	Mata <i>rsp5-1^{ts} his4-912 ΔR5 lys2-128Δ trp1-1(am) ura3-52</i> entstanden durch Kreuzung von <i>rsp5-1</i> (Jon Huibregtse/Stammsammlung) mit DF5	diese Arbeit
<i>rsp5-2</i>	Mata <i>his3-Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	Kai

Material und Methoden

	<i>ade2-1 ade3 rsp5Δ::HIS3 Leu2::rsp5-2::LEU2</i>	Matuschewski
<i>sec1-1</i>	Mata <i>sec1-1^{ts} his3Δ200 leu2-3 2-112 trp1-1 ura3-52</i> entstanden durch Kreuzung von HMSF-1 (Stammsammlung Michael Knop) mit DF5	diese Arbeit
<i>Δede1</i>	Mata <i>ede1::kanMX6 his3Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	diese Arbeit
<i>EDE1Δuba</i>	Mata <i>EDE1uba::kanMX6 his3Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	diese Arbeit
<i>Δede1 rsp5-1</i>	Mata <i>ede1::kanMX6 rsp5-1^{ts}</i> entstanden durch Kreuzung von <i>Δede1</i> und <i>rsp5-1</i>	diese Arbeit
<i>Δddi1</i>	Mata <i>ddi1::kanMX6 his3Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	diese Arbeit
<i>snc1 snc2 (YG8)</i>	<i>can1 his3 his4 trp1 snc1::URA3 snc2::ADE8</i>	J. Gerst (Protopopov et al. 1993)
<i>pep4</i>	Mata <i>pep4::His his3Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	Stammsammlung (HelleUlrich)
<i>pre1-1</i>	Mata <i>lys2-801, ura3-52, leu2-3, 2-112, his3, pre1::TRP1 pTX49pre1-1URA3</i>	Stammsammlung (Thorsten Braun)
<i>PRE1</i>	Mata <i>lys2-801, ura3-52, leu2-3, 2-112, his3, pre1::TRP1 pDP83PRE1URA3</i>	Stammsammlung (Thorsten Braun)
<i>cim3-1</i>	Mata <i>cim3-1, ura3-52, leu2-3</i>	Stammsammlung (Carl Mann)
<i>end3</i>	Mata <i>bar1-1 leu2 his4 ura3 end3</i>	(Raths et al. 1993)
<i>end4</i>	Mata <i>bar1-1 leu2 his4 ura3 end4</i>	(Raths et al. 1993)
<i>PJ69-4a</i>	Mata <i>trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 GAL1::HIS3 GAL met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al. 1996)
<i>SUB280</i>	Mata <i>lys2-801 leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1(am) pUB100:HIS3 ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2::URA3 ubi3-Δ3-Δubi2 ubi4-Δ2::LEU2Ubi1-tail</i>	(Spence et al. 1995)
<i>SUB413</i>	Mata <i>lys2-801 leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1(am) pUB100:HIS3 pGFP tail K63R</i>	(Spence et al. 1995)

Tabelle 3: Liste der verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

1.7 *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle-Vektoren

Die verwendeten offenen Leseraster wurden in folgende Vektoren kloniert: pGAD424, pGBT9 (Bartel et al. 1993) YEplac195, YEplacGal195, Ylplac128, YCplac33 (Gietz et al. 1988). Als DNA Quelle für die N-terminale Fusion von SNC1 und SNC2 mit 3-Myc-, 3-HA- und GFP-Epitopen dienten die Plasmide pMK31-1(3-Myc), pMK29-2 (3-HA), pAM4-3(eGFP) von Michael Knop.

Plasmid	Verwendung/ Charakteristika	Quelle
Ylp128-3HA-SNC1	Expression, Cycloheximid Abschaltungs-Experimenten	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K49R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K75R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K83R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K88R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K91R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R K75R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R K83R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R K88R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R K91R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K75R K88R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K75R K91R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K83R K88R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K75R K83R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K83R K91R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC1(K63R K83R K88R)	Expression	diese Arbeit
Ylp128-3HA-SNC2	Mikroskopie	diese Arbeit
Ylp128-GFP-SNC1	Mikroskopie	diese Arbeit

Material und Methoden

pRS406-GFP-SNC1	Mikroskopie	(Lewis et al. 2000)
pRS406-GFP-SNC1(K63R)	Mikroskopie	diese Arbeit
pRS406-GFP-SNC1(K68R)	Mikroskopie	diese Arbeit
pRS406-GFP-SNC1(K63R K88R)	Mikroskopie	diese Arbeit
pRS406-GFP-SNC1(K63R K83R K88R K91R)	Mikroskopie	diese Arbeit
YEp195-SNC1	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195-3HA-SNC1	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195-SNC2	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195-SNC2(K63R K88R)	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195-3HA-SNC2	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195-3myc-SNC2	Sec9-4 rescue	diese Arbeit
YEp195Gal-6HA-SNC2	Promotor-Abschaltungs-Experimenten, Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-6HA-SNC2(K88R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-6HA-SNC2(K63R K88R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-6HA-SNC2(K63R K88R K83R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-3HA-SNC1	Promotor-Abschaltungs-Experimenten, Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-3HA-SNC1(K63R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-3HA-SNC1(K88R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-3HA-SNC1(K63R K88R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp195Gal-3HA-SNC1(K63R K83R K88R)	Überexpression	diese Arbeit
YEp112-DDI1	Sec9-4 Suppression	diese Arbeit
p423ADH-DDI1	Promotor-Abschaltungs-Experimenten,	diese Arbeit
pGAD-RSP5	2-hybrid und 3-hybrid	Kai Matuschewski
pGAD-RSP5(C777A)	2-hybrid	diese Arbeit
pGAD-WW(RSP5)	2-hybrid	Kai Matuschewski
pGBT-DDI1	2-hybrid	diese Arbeit
pGBT-DDI1 Δ uba	2-hybrid	diese Arbeit
pGBT-DDI1 Δ ubl	2-hybrid	diese Arbeit
pGBT-DDI1 Δ uba Δ ubl	2-hybrid	diese Arbeit
pGBT-(UBA)DDI1	2-hybrid	diese Arbeit
pGAD-4UbiGG	2-hybrid	Neus Colomina
pGAD-4Ubi	2-hybrid	Neus Colomina
pGAD-2UbiGG	2-hybrid	Neus Colomina
pGAD-2Ubi	2-hybrid	Neus Colomina
Yep96-cup-Ubiquitin	Ubiquitin-Expression	(Zhu et al. 1996)
Yep105-cup-MycUbiquitin	Myc-Ubiquitin-Expression	(Zhu et al. 1996)

Tabelle 4: Liste der verwendeten *S. cerevisiae* Plasmide

1.8 *Saccharomyces cerevisiae* Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Flüssigkulturen bei Raumtemperatur bei 120 rpm geschüttelt. Agarplatten wurden ebenso bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Zelldichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm (Eppendorf Messmaschine). Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht etwa 3 x 10⁷ Zellen/ml.

YPD/YPGal-Medium	1% Bacto Yeast Extract (Difco) 2% Bacto Peptone (Difco) 2% Glukose (YPD) oder 4% Galaktose (YPGal)
SC-Medium	3.5% Bacto Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g Zucker (Glukose, Galaktose oder Raffinose) 2 g Aminosäure-Mix ohne Selektionsaminosäuren pro 1 l Wasser
Sporulationsmedium	1 % Kaliumacetat in H ₂ O
YPD-G418	200 mg G418 (Sigma: G-9516) pro l Medium

1.9 Verwendete Plasmide für Expression in *E.coli* und Insektenzellen

Plasmid	Verwendung	Quelle
pGEX-GST-Ubc13	In vitro K63-Ketten	Helle Ulrich (Stammsammlung)

Material und Methoden

pQE30-His-Mms2	In vitro K63-Ketten	Helle Ulrich (Stammsammlung)
pVL1392 Uba1	In vitro K63-Ketten	Kathrin Jepsen (Stammsammlung)
pQE30-His-Sec17	In vitro Ubiquitin-Bindung	(Steel et al. 1999)
pQE30-His-Sec18	In vitro Ubiquitin-Bindung	(Steel, Laude et al. 1999)
Ubilac-GST	In vitro Ubiquitin-Bindung	Kathrin Jepsen (Stammsammlung)
pGEX-GST-UBA(Ede1)	Affinitätssäule	diese Arbeit
pGEX-GST-UBA(DDI1)	Affinitätssäule	diese Arbeit

Tabelle 5: Liste der verwendeten Plasmide für Expression in *E. coli* und Insektenzellen

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

TE-Puffer
10mM Tris
1mM EDTA
pH 8.0
sterilisiert durch autoklavieren

TBE-Puffer
90mM Tris
90mM Borsäure
2,5mM EDTA
als 5x Stocklösung angesetzt und autoklaviert

DNA-Probenpuffer (10x)
0,5% SDS
0,25% Bromphenolblau
25% Glycerol
25mM EDTA

2.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Für analytische und präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten wurden 0,6 - 1,2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für Geltaschen gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung lag zwischen 80 und 120V. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte die aufgetrennte DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die parallele Auftrennung eines Größenmarkers (1 kb DNA-Ladder, Invitrogen) diente zur Ermittlung der Länge der DNA-Fragmente.

2.3 PCR zur Amplifikation von Gensequenzen

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl mit etwa 100 ng Plasmid-DNA bzw. 0.5 µg genomischer DNA in ThermoPol-Puffer (NEB) durchgeführt. Es wurden je 0.5 mM deoxy-Nukleotide, 0.5 µM der entsprechenden Oligonukleotide (*primer*) und 1-5 U Vent-Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktion fand in einem „Mastercycler“-Gerät (Eppendorf) statt. Standard-PCR-Reaktionen wurden 2 min bei 94 °C denaturiert, anschließend wurden 25-30 Zyklen (94°C, 30 sec; 45-55°C, 30 sec; 72°C, 1-5 min) durchlaufen. Die Reaktionen wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.4 Diskontinuierliche PCR-Reaktion (long range)

Zur Amplifikation schwieriger DNA-Sequenzen und zur Amplifikation der Epitop-Kassetten der chromosomalen Epitop-Markierung wurde ein diskontinuierliches PCR-Protokoll verwendet. Nukleotide, Plasmid-DNA und Oligonukleotide wurden wie oben beschrieben zusammengegeben und mit einfach-konzentriertem Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 9.2; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 17.5 mM MgCl_2) versetzt. Die Endkonzentration von MgCl_2 wurde bis 4 mM durch Zugabe von 50 mM MgCl_2 variiert. Die Reaktion wurde durch 0.8 μl Polymerase-Mix (2 μl Taq-Polymerase, 5 U/ μl ; 1 μl Vent-Polymerase, 2 U/ μl) während einer zweiminütigen Denaturierungsphase (94°C) gestartet. Zunächst wurden 9 Zyklen bei niedrigerer Schmelztemperatur (94°C, 20 sec; 45-50°C, 30 sec; 68°C, 2-5 min), anschließend 20 Zyklen unter stringenteren Bedingungen (94°C, 30 sec; 50-60°C, 30 sec; 3 min, 68°C) durchlaufen. Die Verlängerungszeit nahm in den letzten 20 Zyklen pro Zyklus um 20 Sekunden zu. Die Produkte wurden erneut in Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.5 Mutagenese-PCR zur Einführung von Punktmutationen

Punktmutationen wurden durch PCR, die mit einem Oligonukleotidpaar, das die entsprechende Mutation aufwies, durchgeführt. Bei dieser Methode wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Das Oligonukleotidpaar hatte eine Länge von 20 bis maximal 30 Basen, und trug die Mutation in der Mitte. Die Reaktion wurde in 25 μl Volumen durchgeführt (2,5 μl Pfu Puffer, Stratagene; je 0,5 μl Primer, 120 ng/ μl ; 0,625 dNTPs, 10 mM; 0,5 μl Pfu Turbo, Stratagene; 10-60 ng Plasmid-DNA; Rest H_2O dest.). Die Reaktion wurde im Mastercycler unter folgenden Bedingungen inkubiert: 18 Zyklen (95°C 30 sec, 55°C 40 sec, 68°C 2 min pro 1000 bp). Um die Plasmid-DNA der Matritze zu beseitigen wurde eine Stunde mit DpnI, eine Restriktionsendonuklease, die spezifisch methylierte DNA schneidet, verdaut. Anschließend wurde ein Aliquot direkt in *E.coli* transformiert. Durch Sequenzierung wurde die eingefügte Mutation überprüft.

2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

0.5 μg Plasmid-DNA wurde mit 4 μl DYEnamic ET terminator cycle sequencing premix (Amersham) und 5 pmol des Oligonukleotids in einem Volumen von 10 μl versetzt. Es wurden 25 Zyklen (95°C, 20 sec; 45°C, 15 sec; 60°C, 1 min) durchlaufen. Die Proben wurden durch Ethanol gefällt, in einem Gelladepuffer aufgenommen und in einem Abi Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) analysiert. Die Sequenzierung erfolgte durch beauftragte Firmen.

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die DNA wurde über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Quiagen nach alkalischer Lyse isoliert. Kleine Mengen DNA (5-10 μg) wurden aus 4 ml-Über-Nacht-Bakterienkulturen gewonnen, für mittlere und größere Mengen wurden 100 ml bis 400 ml-Kulturen angesetzt. Die Reinigung der Plasmide mittels der Quiagen-Säulen erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers (Quiagen Plasmid Handbuch).

2.8 Restriktionsverdau

Verdaureaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden unter dem vom Vertreiber empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für Verdaureaktionen im präparativen Maßstab wurden zwischen 5 und 20 μg DNA eingesetzt. Bei Restriktionsanalysen

wurden zwischen 0.2 und 0.6 µg Plasmid-DNA verdaut. Präparative Verdaureaktionen wurden durch Vermischen mit einem gleichen Volumen Phenol/Choloform/Isopropanol (25:24:1, v/v) abgestoppt und durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Vektor-DNA wurde, um die Religation zu verhindern, mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) dephosphoryliert.

2.9 Ligation

In der Ligation wurde das Insert in zweifachem molaren Überschuß eingesetzt. Ligationsreaktionen fanden in einfach konzentriertem Ligasepuffer, 0.5 mM ATP, 4 U T4-Ligase statt und wurden bei 16°C für 2 Stunden inkubiert. Die Produkte wurden gegen ddH₂O mikrodialysiert. 2 µl des Ansatzes wurden zur Transformation elektrokompenter *E. coli XL1 Blue*-Zellen verwendet.

3. Mikrobiologische Methoden

3.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E.coli* Bakterien

Die Transformation gereinigter Plasmid-DNA in den Expressionsstamm *E. coli BL21 (DE3) pRIL* sowie in den Bakterienstamm *TG1* erfolgte in CaCl₂-kompetente Zellen mittels Hitzeschock (Cohen et al. 1972). 400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer Übernachtskultur versetzt und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0.4 wurden die Zellen in gekühlte Zentrifugationsbecher überführt und 60 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden bei 3000 rpm, 4°C, für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 15% Glycerin, 10 mM PIPES, pH 7.0) resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert in 10 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut 60 min auf Eis inkubiert. Am Ende wurden die Bakterien in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert nach kurzer Inkubation auf Eis aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2 DNA-Übertragung in CaCl₂-kompetente *E. coli* Zellen

Plasmide wurden in CaCl₂-kompetente Bakterienzellen mittels Hitzeschock übertragen. Dazu wurden 50 µl Bakteriensuspension und 1 µl Plasmid-DNA zusammengegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzepuls von 60-90 sec bei 42 °C wurde 700 µl LB-Medium zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde 120 min bei 37°C geschüttelt, kurz abzentrifugiert und nach Resuspension in 300 µl LB-Medium auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert.

3.3 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA wurde in der Regel nach Transformation in elektrokompente *E. coli XL1-Blue*-Zellen gereinigt. Zur Herstellung der elektrokompenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden nach 60 minütiger Inkubation auf Eis bei 5000 rpm, 4°C für 10 min abzentrifugiert und in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 60 min wurde die Bakterien abzentrifugiert und in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen. Die Bakterien wurden erneut auf Eis inkubiert, zentrifugiert und in 1.5 ml 10% Glycerin resuspendiert. Nach Aliquotieren wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

3.4 DNA-Übertragung durch Elektroporation

Die Plasmid-DNA wurde, wenn nötig nach Mikrodialyse gegen ddH₂O auf Millipore-Filtern, zu 50 µl kompetenten Bakterien gegeben und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite transferiert. Die Elektroporation erfolgte durch einen Puls von 1.8 kV/ 25 µF/ 200 ml im Biorad Gene Pulser II. Die Dauer des Pulses betrug in der Regel 4-5 msec. Die Zellen wurden anschließend mit 700 µl LB-Medium versetzt, 120 min bei 37°C geschüttelt und zuletzt auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3.5 Transformation von DNA nach der Lithiumacetat Methode in *Saccharomyces cerevisiae*

1 ml einer Übernachtskultur im Selektionsmedium wurde zu 20 ml frischen Mediums gegeben und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Transformation wurden 2 ml Aliquots dieser Kultur verwendet und bei 3000 rpm, 23 °C, für 3 min abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 1 ml TE/LiOAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Zum Pellet wurden 5 µl einzelstängige DNA (denatuierte Lachsspermien-DNA), 1-5 µl der zu transformierenden DNA und 300 µl TE/PEG (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 40 % PEG3350) gegeben. Die Suspension wurde 30 min auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Hitzeimpuls (42°C, 15 min) wurde die Suspension bei 3500 rpm, 3 min, 23 °C, zentrifugiert, in ddH₂O resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Bei Kanamycin-Resistenz wurden die Hefezellen in 3 ml YPD-Medium resuspendiert, über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und nach Zentrifugation auf YPD-G418-Platten ausplattiert.

3.6 Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine Übernachtskultur im entsprechenden Selektionsmedium wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt und bei Raumtemperatur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 23 °C, 5 min) und im 0.5-fachen Volumen an sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Hefepellet im 0.1-fachen Volumen SORB (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 1 M Sorbitol) aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde das überstehende SORB komplett abgenommen. Die Zellen wurden in 360 µl SORB bei 50 ml ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl denaturierter Einzelstrang-DNA wurde die Suspension á 50 µl aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

3.7 Integrative Transformation über homologe Rekombination

Für eine Transformation mit gereinigter Plasmid-DNA wurden 10 µl, für die Transformation mit PCR-Produkt 50 µl kompetenter Hefezellen eingesetzt. Die DNA wurde zu den Zellen gegeben und mit dem 6-fachen Volumen TE/PEG versetzt. Die Zellen wurden 30 min am Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1/9-Volumen an DMSO zugegeben. Nach einem Hitzeimpuls (15 min, 42°C) wurden die Hefen zentrifugiert, in ddH₂O resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Bei Verwendung des Kanamycin-Markers wurde die Zellen zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

3.8 Kreuzung von Hefestämmen

Zwei Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps (MATa und MAT α) wurden in YPD-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt. Aliquots der gleichen Zellmenge wurden gemischt und je 10 μ l davon auf eine YPD-Agarplatte getüpfelt. Nach 3 Stunden Inkubation konnten fusionierte Hefezellen aufgrund ihrer typischen Morphologie (hantelförmige Zellen die in der Mitte eine Knospe tragen) identifiziert, und mit dem Mikromanipulator (Singer MSM Systems) isoliert werden.

3.9 Serielle Verdünnungsreihen

Für die Analyse von Hefemutanten wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten des entsprechenden Selektionsmediums getüpfelt. Übernachtskulturen des Hefestammes im entsprechenden Wachstumsmedium wurden mit ddH₂O auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt und drei weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 pipettiert. Je 5 μ l jeder Verdünnung wurden nebeneinander auf Platten getüpfelt und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert.

3.10 Tetradenanalyse

Diploide Hefezellen (500 μ l) einer stationären Kultur wurden abzentrifugiert und drei mal in Sporulationsmedium gewaschen. Nach drei Tagen bei 23°C, wenn die Sporen ausgereift waren, wurde 1 ml abzentrifugiert, und in 1 ml H₂O aufgenommen. Der Verdau des Tetradsackes erfolgte in STE-Puffer (1 M Sorbitol, 10 mM Tris pH8, 0, 25 mM EDTA frisch zugegeben 5 % 1M DTT. Für die Reaktion mit Zymolyase wurden 40 μ l Zellen, 40 μ l STE-Puffer und 1 μ l Zymolyase (0,5 mg/ml) verwendet und 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 20 μ l der Zellsuspension wurden strichförmig auf einer YPD-Platte ausgezogen. Die Trennung der Tetraden und das Isolieren der Sporen erfolgte mit einem Mikromanipulator (Singer MSM Systems). Zur Ausreifung (Germination) der Sporen und Wachstum der Kolonien wurden die Platten mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

3.11 Nachweis von Protein-Protein WW mit dem Zwei-Hybrid-System

Die genetische Information eines der zu untersuchenden Gene wurde im Leseraster hinter die aktivierende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (pGAD-Vektor) kloniert. Die Information des anderen Proteins wurde entsprechend hinter die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kloniert (pGBT9-Vektor). Der Hefestamm *PJ69-4a* wurde mit beiden Vektoren sowie mit den jeweiligen Leervektoren als Kontrolle transformiert. Transformierte Hefezellen wurden auf Sc-Leu-Trp-Platten bei 30°C angezogen und anschließend auf Sc-Leu-Trp-His-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen 3-Aminotriazol supplementiert waren, analysiert.

3.12 Mikroskopische Methoden

GFP-Epitop markierte Hefezellen wurden durch eine Dekonvolutions-Mikroskopanlage mit einem Leica DMRXA-Mikroskop sichtbar gemacht. Der Monochromator Polychrome II stammte von T.I.L.L. Phototonics GMBH. Die Steuerung erfolgte durch Openlab 2.2.5 Improvisation Ltd. an einem Apple G3-Computer. Die GFP Anregung erfolgte bei 471 nm und die Emission bei 510 nm. Da zur Ausbildung des GFP-Fluorophors Sauerstoff benötigt wird, wurden die Zellen in

Schüttelkolben kultiviert, um eine optimale Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. 5 µl einer mit eiskaltem H₂O gewaschenen, dichten Zellsuspension wurden auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas, dass leicht angedrückt wurde, fixiert. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte unmittelbar.

3.13 Luzifer yellow Färbung

Logarithmische Zellen mit einer OD₆₀₀ 0,2 wurden verwendet. Die Zellen wurden bei 3000rpm 5 min bei Raumtemperatur geerntet, in 120 µl YPD verdünnt, und mit 4 mg/ml (80µl) Luzifer Yellow versetzt (Stocklösung:10 mg/ml). Der Ansatz wurde 30 min bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Das Waschen der Zellen erfolgte 5 mal mit eiskaltem Waschpuffer (50 mM NaPhosphat, 10 mM NaAzid, 10 mM NaFluorid, pH7,5). Die Zentrifugation erfolgte 1 min bei 3000 rpm. Das Pellet wurde in 10 µl aufgelöster 1,6 %iger Agarose (maximal 50°C) verdünnt und auf einen Objektträger aufgetragen. Die mikroskopische Analyse erfolgte durch Anregung des Farbstoffes bei 470 nm.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefe durch alkalische Lyse

Zur Lyse von in Flüssigkultur wachsenden Hefezellen wurde eine OD₆₀₀ von 0.5-0.7 eingesetzt. Die Zellen wurden sedimentiert (1 min, 13000 rpm), in 400 µL Lyse-Puffer (1.85 M NaOH, 7.5 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Alternativ wurde die Hälfte einer großen Hefekolonie in 200 µL H₂O suspendiert, mit 30 µl Lyse-Puffer versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Um Hefezellproteine zu untersuchen wurde sofort nach Lyse eine TCA-Fällung durchgeführt.

Die Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen erfolgte bei einer TCA-Konzentration von 6-10 % (w/v). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 20000 g, 4°C). Das Pellet wurde mit -20° C kaltem Aceton gewaschen, bei 28°C getrocknet und in 90 µL Tricin SDS Probenpuffer (66 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol, 0.01 % (w/v) Coomassie G250) bzw. 20 µL HU-Puffer (8 M Urea, 5 % SDS, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.01 % Bromphenolblau, 1,5 % (w/v) DTT) aufgenommen. Um noch vorhandene TCA zu neutralisieren wurden 50 µL bzw. 2 µL 1 M Tris-Base zur Suspension gegeben. Die Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert, ehe sie mittels Tricin-Gelelektrophorese und Western Blotting analysiert wurden.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BioRad-Proteinassay (BioRad, Bradford-assay) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Außer SNC1 und SNC2 wurden die Proteine durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Elektrophorese

wurde in einer Hoefer-Vertikalelektrophoresekommer durchgeführt. Es wurden 10-15 %ige Trenngele, und 4 %ige Sammelgele verwendet. Anodenpuffer (0.2 M Tris/HCl, pH 8.9) und Kathodenpuffer (0.1 M Tris/HCl, 0.1 M Tricin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.25) waren unterschiedlich.

4.4 Tricine-Gelelektrophorese

SNC1/SNC2 Proteine wurden ausschließlich durch diskontinuierliche vertikale Ntris(hydroxymethyl)methylglycin (kurz Tricin) - Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Schagger und von Jagow 1987). Die für die Gelelektrophorese verwendeten Gele hatten eine Endkonzentrationen von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid von 10 %-15 % (w/v). Die Proben wurden in Tricin SDS Probenpuffer (66 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol, 0.01 % (w/v) Coomassie G250) gelöst, 30 min lang bei 37°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Vertikalelektrophorese erfolgte in einem Zweipuffer-System (Anodenpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8.9; Kathodenpuffer: 10 mM Tris, 10 mM Tricin, 0.01 % (w/v) SDS, pH 8.25) bei 30 mA. Als Größenstandard wurde prestained Proteinmarker (Boehringer; 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10 kDa) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert.

4.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Gele wurden in einer gefilterten Lösung 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in Wasser:Methanol:Essigsäure 9:9:2 für mindestens 4 Stunden geschüttelt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel in einer Lösung identischer Zusammensetzung ohne Coomassie entfärbt.

4.6 Silber-Färbung von Proteingelen

Das zu färbende Gel wurde in 50 % Methanol für 3 Stunden geschüttelt, 30 Minuten in H₂O bidest. gewaschen, 15 Minuten in Färbelosung gefärbt (Färbelosung: A: 0,8 g in 4 ml H₂O bidest., B: 21 ml 0,36 % NaOH, 1,4 ml 28 %ige Ammoniumhydroxid; A tropfenweise zu B zugeben), danach 3 mal 5 min gewaschen. Die Entwicklung der Banden erfolgte in 200 ml Entwicklerlösung (200 ml H₂O bidest., 2,5 ml 1 % Zitronensäure, 0,25 ml 38 %ige Formaldehydlösung, Zugabe von H₂O bidest. bis 500 ml). Nach Erscheinen der Banden wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 %igem Methanol gestoppt.

4.7 Western blot

Die zu analysierenden Proteinproben wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und im Tank in einfach konzentriertem Transferpuffer (20 mM Tris, 144 mM Glycin, 0.01 % SDS, 20 % Methanol) auf Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von 70 V bei Raumtemperatur für 60 bis 90 min statt. Die Membran wurde für 30 min in TBST + 0,5 % Milchpulver inkubiert. Die Bindung des ersten Antikörpers erfolgte in frischem TBST/Milchpulver über Nacht bei 4°C. Nach Waschen der Membran 3 mal 10 Minuten in TBST wurde in TBST/Milchpulver mit dem zweiten Antikörper für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut 3 mal 10 Minuten gewaschen und nach Inkubation mit ECL-Lösung (Amersham) aufgrund der Chemilumineszenz auf ECL-Hyperfilm nach Angaben des Herstellers analysiert.

4.8 Reinigung rekombinanter Proteine unter nativen Bedingungen

Die Expression von GST- und His-Epitop markierten Hefe-Proteinen erfolgte in *BL21DE E. coli*-Zellen. Dazu wurden 1 bis 2 Liter Kultur bis zu einer OD₆₀₀ 0,7 bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 2 mM IPTG für 2 bis 3 Stunden. Die Zellen wurden geerntet und in Resuspensionspuffer aufgenommen (50 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, Leupeptin 1 µg/ml, Aprotinin 1 µg/ml, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) Für die Zelllyse wurde 1 mg/ml Lysozym zugegeben und 1 h bei 4° auf einem Drehrad rotiert. Anschließend wurde 1 h bei 100000 g zentrifugiert. Alternativ erfolgte die Lyse mit zwei Durchläufen in der „french press“ und anschließender Zentrifugaion bei 20000 g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, Glutathion-Sepharose (Pharmacia) oder NiNTA (Quiagen) zugegeben, und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit mindestens 150 ml Resuspensionspuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Glutathion oder 0,5 M Imidazol im Waschpuffer.

4.9 Immunpräzipitation von Proteinen

200-300 OD einer logarithmischen Zellkultur wurden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3500 rpm, 2 min) und in eiskaltem Lysepuffer (PBS, 1 % NP40, 20 mM NEM, 1 mM PMSF) aufgenommen. Zu der Mischung wurden bis ca 2 mm unter den Meniskus Glasperlen (Glass beads, acid-washed, R 425-600 µm, Sigma) zugegeben. Diese wurde daraufhin je 30 sec auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt und 30 sec auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt. Bevor die Zentrifugation bei 20000 g erfolgte, wurde dem Ansatz nochmals Lysepuffer zugegeben und eine Stunde auf Eis stehen gelassen. Es wurden 2 µg beads-gekoppelter Antikörper zugegeben und die Lösung für 60 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Das Waschen der beads erfolgte durch Zugabe von 5x Lysepuffer, 2x Lysepuffer ohne NP40. Die beads wurden anschließend in 2x Lämmli-Puffer 5 min auf 95°C erhitzt und in Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

4.10 Analyse der Membranassoziation eines Proteins

Eine Hefekultur wurde im selektiven Medium bei der gewünschten Temperatur zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Die Hefezellen wurden nach Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C, 5 min in 150 µl Lysepuffer (200 mM Tris/HCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20 mM NEM, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen und mit Glasperlen lysiert. Das Lysat wurde bei 3000 g, 4°C, 2 min zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurden entnommen, 2 x Lämmli-Puffer versetzt und bei 65°C denaturiert (Totalextrakt). 75 µl des Überstandes wurden bei 13000 g, 4°C, 1 h zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes (lösliche Fraktion) sowie das Pellet (Membranfraktion) wurden in HU-Puffer denaturiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer aufgenommen und in mehrere Proben aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Einzelpellets entweder in Lysepuffer, in 0.1 % SDS-Lösung oder in 1%iger Tritonlösung für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden durch Zentrifugation bei 20000 g in lösliche und Membran-assoziierte Fraktion aufgetrennt und in 2 x Lämmli-Puffer denaturiert. Die denaturierten Proteinproben wurden anschließend durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunoblot untersucht.

4.11 Analyse der Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin

Durch Verwendung von chromosomal integrativen Shuttle-Vektoren wurden SNC1 und SNC2 zusammen mit deren Promotor aus chromosomaler DNA kloniert und mit

einem N-terminalen Epitop versehen. Die Transformation in wt-Zellen erfolgte jeweils zusammen mit Ubi und myc-Ubi exprimierenden Vektoren, die über einen mit Kupfersulfat induzierbaren Promotor verfügten. Durch Zugabe von 1 μ M CuSO₄ wurde die Expression von Ubiquitin oder Myc-Ubiquitin induziert. Die Zellen wurden fünf Stunden in logarithmischer Phase bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert.

4.12 Analyse der Proteinstabilität (Promotor- und Cycloheximid Promotor Abschaltungs-Experimenten)

Die Stabilität von Proteinen wurde durch gezieltes Abschalten des entsprechenden Genes, dass unter der Kontrolle eines GAL1,10-Promotors galaktoseinduzierbar und glucosereprimierbar war. Zusätzlich wurde die Proteinssynthese durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt. Alternativ wurde endogen exprimiertes Protein durch Cycloheximidzugabe in der Synthese reprimiert (Cycloheximid shut off). Hefekulturen wurden in YPGal-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei Raumtemperatur angezogen und anschließend für zwei Stunden auf die gewünschte Temperatur (meist 37°C) gebracht. Die Zellen wurden bei 3500 rpm, 23 °C für 3 min abzentrifugiert und schnell in vorgewärmtem YPD-Medium, dem 0.5 mg/ml Cycloheximid zugesetzt worden waren, resuspendiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 2 ml der Hefesuspension entnommen und die Proteine durch alkalische Lyse und TCA-Präparation für die Gelauftragung vorbereitet.

4.13 Affinitätssäule mit GST markierten Proteinen

Jeweils 500 μ l Glutathion Sepharose wurden 1 h bei 4°C in PBS mit GST, GST-UBA(EDE1) und GST-UBA(DDI1) beladen. Hefezelllysate wurden 1 h mit der Glutathionsepharose bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, danach auf eine Säule transferiert. Nach Bindung von GST und der GST-Fusionsproteine GST-UBA(DDI1) und GST-UBA(EDE1) an Glutathion-Sepharose, wurde die Sepharose mit Wildtyp-Hefelysate inkubiert. Die Elution erfolgte sequentiell mit 0,5 M NaCl, 1M NaCl und 0,2% SDS. Die Elutionsfraktionen wurden gefällt und parallel auf ein Gel für Silberfärbung und ein Gel für Western-Blot aufgetragen.

Literatur

Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan and M. Hochstrasser (2000). The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 11, 3365-80.

Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland and S. D. Emr (2002a). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3, 283-9.

Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S. D. Emr (2002b). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3, 271-82.

Babst, M., G. Odorizzi, E. J. Estepa and S. D. Emr (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1, 248-58.

Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa and S. D. Emr (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J* 17, 2982-93.

Bailly, V., J. Lamb, P. Sung, S. Prakash and L. Prakash (1994). Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev* 8, 811-20.

Bartel, P., C. T. Chien, R. Sternglanz and S. Fields (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-4.

Bauer, G. A. and P. M. Burgers (1990). Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res* 18, 261-5.

Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl and E. Seemuller (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-80.

Bays, N. W., S. K. Wilhovsky, A. Goradia, K. Hodgkiss-Harlow and R. Y. Hampton (2001). HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12, 4114-28.

Beal, R., Q. Deveraux, G. Xia, M. Rechsteiner and C. Pickart (1996). Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 861-6.

Beck, T., A. Schmidt and M. N. Hall (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol* 146, 1227-38.

- Beckers, C. J. and W. E. Balch (1989). Calcium and GTP: essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Cell Biol* 108, 1245-56.
- Benedetti, H., S. Rath, F. Crausaz and H. Riezman (1994). The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol Biol Cell* 5, 1023-37.
- Bertolaet, B. L., D. J. Clarke, M. Wolff, M. H. Watson, M. Henze, G. Divita and S. I. Reed (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* 8, 417-22.
- Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer and R. C. Piper (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 4, 534-9.
- Bisson, L. F. (1988). Derepression of high-affinity glucose uptake requires a functional secretory system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 170, 2654-8.
- Block, M. R., B. S. Glick, C. A. Wilcox, F. T. Wieland and J. E. Rothman (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7852-6.
- Braun, S., K. Matuschewski, M. Rape, S. Thoms and S. Jentsch (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *Embo J* 21, 615-21.
- Brennwald, P., B. Kearns, K. Champion, S. Keranen, V. Bankaitis and P. Novick (1994). Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* 79, 245-58.
- Broomfield, S., B. L. Chow and W. Xiao (1998). MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5678-83.
- Bugnicourt, A., M. Froissard, K. Sereti, H. D. Ulrich, R. Haguenauer-Tsapis and J. M. Galan (2004). Antagonistic Roles of ESCRT and Vps Class C/HOPS Complexes in the Recycling of Yeast Membrane Proteins. *Mol Biol Cell*.
- Busch, H. and I. L. Goldknopf (1981). Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 40, 173-87.
- Cao, K., R. Nakajima, H. H. Meyer and Y. Zheng (2003). The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* 115, 355-67.
- Cao, X., N. Ballew and C. Barlowe (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *Embo J* 17, 2156-65.

- Cao, X. and C. Barlowe (2000). Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J Cell Biol* 49, 55-66.
- Cenciarelli, C., D. Hou, K. C. Hsu, B. L. Rellahan, D. L. Wiest, H. T. Smith, V. A. Fried and A. M. Weissman (1992). Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science* 257, 795-7.
- Chang, A., S. Cheang, X. Espanel and M. Sudol (2000). Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275, 20562-71.
- Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda and A. Varshavsky (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-83.
- Chen, L. and N. G. Davis (2002). Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic* 3, 110-23.
- Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98-106.
- Chen, L., U. Shinde, T. G. Ortolan and K. Madura (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* 2, 933-8.
- Chin, L. S., J. P. Vavalle and L. Li (2002). Staring, a novel E3 ubiquitin-protein ligase that targets syntaxin 1 for degradation. *J Biol Chem* 277, 35071-9.
- Ciechanover, A., S. Elias, H. Heller and A. Hershko (1982). Covalent affinity purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 257, 2537-42.
- Cohen, M., J. Casey, M. Rabinowitz and G. S. Getz (1972). Hybridization of mitochondrial transfer RNA and mitochondrial DNA in petite mutants of yeast. *J Mol Biol* 63, 441-51.
- Conibear, E. and T. H. Stevens (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1404, 211-30.
- Couve, A. and J. E. Gerst (1994). Yeast Snc proteins complex with Sec9. Functional interactions between putative SNARE proteins. *J Biol Chem* 269, 23391-4.
- Couve, A., V. Protopopov and J. E. Gerst (1995). Yeast synaptobrevin homologs are modified posttranslationally by the addition of palmitate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5987-91.
- Davis, N. G., J. L. Horecka and G. F. Sprague, Jr. (1993). Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J Cell Biol* 122, 53-65.

- Di Guglielmo, G. M., P. C. Baass, W. J. Ou, B. I. Posner and J. J. Bergeron (1994). Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *Embo J* 13, 4269-77.
- Diaz, R., L. S. Mayorga, P. J. Weidman, J. E. Rothman and P. D. Stahl (1989). Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 339, 398-400.
- Dupre, S. and R. Haguenauer-Tsapis (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* 21, 4482-94.
- Dupre, S. and R. Haguenauer-Tsapis (2003). Raft partitioning of the yeast uracil permease during trafficking along the endocytic pathway. *Traffic* 4, 83-96.
- Egner, R. and K. Kuchler (1996). The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett* 378, 177-81.
- Elazar, Z., R. Scherz-Shouval and H. Shorer (2003). Involvement of LMA1 and GATE-16 family members in intracellular membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1641, 145-56.
- Elsasser, S., D. Chandler-Militello, B. Mueller, J. Hanna and D. Finley (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem*.
- Elsasser, S., R. R. Gali, M. Schwickart, C. N. Larsen, D. S. Leggett, B. Müller, M. T. Feng, F. Tubing, G. A. Dittmar and D. Finley (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4, 725-30.
- Fasshauer, D., W. K. Eliason, A. T. Brunger and R. Jahn (1998a). Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37, 10354-62.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger and R. Jahn (1998b). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15781-6.
- Felder, S., K. Miller, G. Moehren, A. Ullrich, J. Schlessinger and C. R. Hopkins (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 61, 623-34.
- Finley, D., E. Ozkaynak and A. Varshavsky (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-46.

- Fisher, R. D., B. Wang, S. L. Alam, D. S. Higginson, H. Robinson, W. I. Sundquist and C. P. Hill (2003). Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* 278, 28976-84.
- Fujita, M., M. Itoh, M. Shibata, S. Taira and M. Taira (2002). Gene expression pattern analysis of the tight junction protein, Claudin, in the early morphogenesis of *Xenopus* embryos. *Gene Expr Patterns* 2, 23-6.
- Gagny, B., A. Wiederkehr, P. Dumoulin, B. Winsor, H. Riezman and R. Haguenauer-Tsapis (2000). A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* 113, 3309-19.
- Galan, J. M. and R. Haguenauer-Tsapis (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* 16, 5847-54.
- Galan, J. M., V. Moreau, B. Andre, C. Volland and R. Haguenauer-Tsapis (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* 271, 10946-52.
- Galan, J. M., A. Wiederkehr, J. H. Seol, R. Haguenauer-Tsapis, R. J. Deshaies, H. Riezman and M. Peter (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol Cell Biol* 21, 3105-17.
- Gerst, J. E. (1997). Conserved alpha-helical segments on yeast homologs of the synaptobrevin/VAMP family of v-SNAREs mediate exocytic function. *J Biol Chem* 272, 16591-8.
- Gerst, J. E. (1999). SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 55, 707-34.
- Ghislain, M., R. J. Dohmen, F. Levy and A. Varshavsky (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 4884-99.
- Ghislain, M., A. Udvardy and C. Mann (1993). *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* 366, 358-62.
- Gietz, R. D. and A. Sugino (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-34.
- Gitan, R. S., M. Shababi, M. Kramer and D. J. Eide (2003). A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem*.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried and D. Finley (1998). A subcomplex of the proteasome

regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-23.

Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik and R. Huber (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-71.

Gurunathan, S., D. Chapman-Shimshoni, S. Trajkovic and J. E. Gerst (2000). Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis. *Mol Biol Cell* 11, 3629-43.

Gurunathan, S., M. Marash, A. Weinberger and J. E. Gerst (2002). t-SNARE phosphorylation regulates endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell* 13, 1594-607.

Haas, A. L., J. V. Warms and I. A. Rose (1983). Ubiquitin adenylate: structure and role in ubiquitin activation. *Biochemistry* 22, 4388-94.

Haglund, K., N. Shimokawa, I. Szymkiewicz and I. Dikic (2002). Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12191-6.

Hanson, P. I., R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn and J. E. Heuser (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90, 523-35.

Helliwell, S. B., S. Losko and C. A. Kaiser (2001). Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol* 153, 649-62.

Hettema, E. H., M. J. Lewis, M. W. Black and H. R. Pelham (2003). Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *Embo J* 22, 548-57.

Hetzer, M., H. H. Meyer, T. C. Walther, D. Bilbao-Cortes, G. Warren and I. W. Mattaj (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 3, 1086-91.

Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-30.

Hicke, L. and R. Dunn (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-72.

Hicke, L. and H. Riezman (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-87.

Hiller, M. M., A. Finger, M. Schweiger and D. H. Wolf (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-8.

- Hitchcock, A. L., K. Auld, S. P. Gygi and P. A. Silver (2003). A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12735-40.
- Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-41.
- Hofmann, K. and P. Bucher (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* 21, 172-3.
- Hofmann, K. and L. Falquet (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26, 347-50.
- Hofmann, R. M. and C. M. Pickart (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-53.
- Holtzman, D. A., S. Yang and D. G. Drubin (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 122, 635-44.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich and S. Jentsch (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-86.
- Horak, J. and D. H. Wolf (1997). Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J Bacteriol* 179, 1541-9.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon and P. M. Howley (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5249.
- Jackson, P. K., A. G. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J. Y. Hsu, B. K. Kaiser and J. D. Reimann (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10, 429-39.
- James, P., J. Halladay and E. A. Craig (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-36.
- Jarosch, E., U. Lenk and T. Sommer (2003). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol* 223, 39-81.
- Jarosch, E., C. Taxis, C. Volkwein, J. Bordallo, D. Finley, D. H. Wolf and T. Sommer (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134-9.

- Jeffers, M., L. Schmidt, N. Nakaigawa, C. P. Webb, G. Weirich, T. Kishida, B. Zbar and G. F. Vande Woude (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11445-50.
- Jentsch, S., J. P. McGrath and A. Varshavsky (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**, 131-4.
- Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-52.
- Johnson, E. S., P. C. Ma, I. M. Ota and A. Varshavsky (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**, 17442-56.
- Jungmann, J., H. A. Reins, C. Schobert and S. Jentsch (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* **361**, 369-71.
- Kang, R. S., C. M. Daniels, S. A. Francis, S. C. Shih, W. J. Salerno, L. Hicke and I. Radhakrishnan (2003). Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell* **113**, 621-30.
- Katzmann, D. J., M. Babst and S. D. Emr (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi and S. D. Emr (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Katzmann, D. J., S. Sarkar, T. Chu, A. Audhya and S. D. Emr (2004). Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol Biol Cell* **15**, 468-80.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, D. Schuurhuis, J. Griffith, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Y. Rudensky, F. Ossendorp, C. J. Melief, W. Stoorvogel and H. J. Geuze (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* **155**, 53-63.
- Klionsky, D. J. and Y. Ohsumi (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 1-32.
- Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer and S. Jentsch (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-44.
- Kölling, R. and C. P. Hollenberg (1994). The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *Embo J* **13**, 3261-71.
- Kölling, R. and C. P. Hollenberg (1994). The first hydrophobic segment of the ABC-transporter, Ste6, functions as a signal sequence. *FEBS Lett* **351**, 155-8.

- Kölling, R. and S. Losko (1997). The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *Embo J* 16, 2251-61.
- Kondo, H., C. Rabouille, R. Newman, T. P. Levine, D. Pappin, P. Freemont and G. Warren (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-8.
- Kweon, D. H., C. S. Kim and Y. K. Shin (2003). Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nat Struct Biol* 10, 440-7.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lam, Y. A., T. G. Lawson, M. Velayutham, J. L. Zweier and C. M. Pickart (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-7.
- Latterich, M., K. U. Frohlich and R. Schekman (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885-93.
- Lawrence, C. (1994). The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays* 16, 253-8.
- Lewis, M. J., B. J. Nichols, C. Prescianotto-Baschong, H. Riezman and H. R. Pelham (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* 11, 23-38.
- Lewis, M. J. and H. R. Pelham (2002). A new yeast endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8. *Traffic* 3, 922-9.
- Lin, A., S. Patel and M. Latterich (2001). Regulation of organelle membrane fusion by Pkc1p. *Traffic* 2, 698-704.
- Losko, S., F. Kopp, A. Kranz and R. Kölling (2001). Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* Mutant. *Mol Biol Cell* 12, 1047-59.
- Lu, P. J., G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies and K. P. Lu (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784-8.
- Lustgarten, V. and J. E. Gerst (1999). Yeast VSM1 encodes a v-SNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol Cell Biol* 19, 4480-94.
- Marash, M. and J. E. Gerst (2001). t-SNARE dephosphorylation promotes SNARE assembly and exocytosis in yeast. *Embo J* 20, 411-21.

- Marash, M. and J. E. Gerst (2003). Phosphorylation of the autoinhibitory domain of the Sso t-SNAREs promotes binding of the Vsm1 SNARE regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 3114-25.
- Medintz, I., H. Jiang and C. A. Michels (1998). The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. *J Biol Chem* 273, 34454-62.
- Meyer, H. H., Y. Wang and G. Warren (2002). Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *Embo J* 21, 5645-52.
- Miyazawa, K., K. Toyama, A. Gotoh, P. C. Hendrie, C. Mantel and H. E. Broxmeyer (1994). Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood* 83, 137-45.
- Moraes, T. F., R. A. Edwards, S. McKenna, L. Pastushok, W. Xiao, J. N. Glover and M. J. Ellison (2001). Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13. *Nat Struct Biol* 8, 669-73.
- Mori, S., L. Claesson-Welsh, Y. Okuyama and Y. Saito (1995). Ligand-induced polyubiquitination of receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 32-9.
- Mori, S., C. H. Heldin and L. Claesson-Welsh (1992). Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J Biol Chem* 267, 6429-34.
- Mueller, T. D. and J. Feigon (2002). Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J Mol Biol* 319, 1243-55.
- Müller, J. M., C. Rabouille, R. Newman, J. Shorter, P. Freemont, G. Schiavo, G. Warren and D. T. Shima (1999). An NSF function distinct from ATPase-dependent SNARE disassembly is essential for Golgi membrane fusion. *Nat Cell Biol* 1, 335-40.
- Müller, J. M., J. Shorter, R. Newman, K. Deinhardt, Y. Sagiv, Z. Elazar, G. Warren and D. T. Shima (2002). Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion. *J Cell Biol* 157, 1161-73.
- Munn, A. L. and H. Riezman (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* 127, 373-86.
- Nie, J., M. A. McGill, M. Dermer, S. E. Dho, C. D. Wolting and C. J. McGlade (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *Embo J* 21, 93-102.

- Novick, P., S. Ferro and R. Schekman (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-9.
- Novick, P., C. Field and R. Schekman (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-15.
- Odorizzi, G., M. Babst and S. D. Emr (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95, 847-58.
- Oldham, C. E., R. P. Mohny, S. L. Miller, R. N. Hanes and J. P. O'Bryan (2002). The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol* 12, 1112-6.
- Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi and U. Schubert (2000). Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278, 111-21.
- Paolini, R. and J. P. Kinet (1993). Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. *Embo J* 12, 779-86.
- Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley and S. P. Gygi (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921-6.
- Peters, J. M., M. J. Walsh and W. W. Franke (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *Embo J* 9, 1757-67.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-33.
- Pickart, C. M., E. M. Kasperek, R. Beal and A. Kim (1994). Substrate properties of site-specific mutant ubiquitin protein (G76A) reveal unexpected mechanistic features of ubiquitin-activating enzyme (E1). *J Biol Chem* 269, 7115-23.
- Pickart, C. M. and A. T. Vella (1988). Ubiquitin carrier protein-catalyzed ubiquitin transfer to histones. Mechanism and specificity. *J Biol Chem* 263, 15076-82.
- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli and P. P. Di Fiore (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-5.
- Ponting, C. P. and E. Birney (2000). Identification of domains from protein sequences. *Methods Mol Biol* 143, 53-69.
- Pornillos, O., S. L. Alam, R. L. Rich, D. G. Myszka, D. R. Davis and W. I. Sundquist (2002). Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo J* 21, 2397-406.

- Prag, G., S. Misra, E. A. Jones, R. Ghirlando, B. A. Davies, B. F. Horazdovsky and J. H. Hurley (2003). Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p. *Cell* 113, 609-20.
- Protopopov, V., B. Govindan, P. Novick and J. E. Gerst (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, 855-61.
- Rabinovich, E., A. Kerem, K. U. Frohlich, N. Diamant and S. Bar-Nun (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 22, 626-34.
- Rabouille, C., H. Kondo, R. Newman, N. Hui, P. Freemont and G. Warren (1998). Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell* 92, 603-10.
- Raiborg, C., K. G. Bache, A. Mehlum, E. Stang and H. Stenmark (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J* 20, 5008-21.
- Rape, M., T. Hoppe, I. Gorr, M. Kalocay, H. Richly and S. Jentsch (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-77.
- Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz and H. Riezman (1993). end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 120, 55-65.
- Reed, S. I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-64.
- Reggiori, F. and H. R. Pelham (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J* 20, 5176-86.
- Reggiori, F. and H. R. Pelham (2002). A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* 4, 117-23.
- Richly, H., M. Rape, S. Braun, S. Rumpf and S. Jentsch (2004). A Series of Ubiquitin-Binding Factors Connects Cdc48/p97 to substrate Multiubiquitination and Proteasomal Targeting. *Cell*, submitted.
- Rieder, S. E., L. M. Banta, K. Kohrer, J. M. McCaffery and S. D. Emr (1996). Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell* 7, 985-99.
- Rizo, J. and T. C. Sudhof (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3, 641-53.
- Robzyk, K., J. Recht and M. A. Osley (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-4.

- Rocca, A., C. Lamaze, A. Subtil and A. Dautry-Varsat (2001). Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 12, 1293-301.
- Rossi, G., A. Salminen, L. M. Rice, A. T. Brunger and P. Brennwald (1997). Analysis of a yeast SNARE complex reveals remarkable similarity to the neuronal SNARE complex and a novel function for the C terminus of the SNAP-25 homolog, Sec9. *J Biol Chem* 272, 16610-7.
- Roth, A. F. and N. G. Davis (1996). Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* 134, 661-74.
- Rothman, J. E. (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 29, 81-96.
- Rotin, D., O. Staub and R. Haguenauer-Tsapis (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176, 1-17.
- Roy, L., J. J. Bergeron, C. Lavoie, R. Hendriks, J. Gushue, A. Fazel, A. Pelletier, D. J. Morre, V. N. Subramaniam, W. Hong and J. Paiement (2000). Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 11, 2529-42.
- Sachse, M., P. van Kerkhof, G. J. Strous and J. Klumperman (2001). The ubiquitin-dependent endocytosis motif is required for efficient incorporation of growth hormone receptor in clathrin-coated pits, but not clathrin-coated lattices. *J Cell Sci* 114, 3943-52.
- Sagiv, Y., A. Legesse-Miller, A. Porat and Z. Elazar (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *Embo J* 19, 1494-504.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79.
- Scheffner, M., U. Nuber and J. M. Huibregtse (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-3.
- Schnell, J. D. and L. Hicke (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278, 35857-60.
- Schoch, S., F. Deak, A. Konigstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Sudhof and E. T. Kavalali (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294, 1117-22.

- Schubert, C., H. Richly, S. Rumpf and A. Buchberger (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *Embo Reports*.
- Scott, P. M., P. S. Bilodeau, O. Zhdankina, S. C. Winistorfer, M. J. Hauglund, M. M. Allaman, W. R. Kearney, A. D. Robertson, A. L. Boman and R. C. Piper (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 6, 252-9.
- Seelmeier, S., H. Schmidt, V. Turk and K. von der Helm (1988). Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6612-6.
- Seufert, W. and S. Jentsch (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J* 9, 543-50.
- Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout and R. J. Lefkowitz (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-13.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-46.
- Shih, S. C., D. J. Katzmann, J. D. Schnell, M. Sutanto, S. D. Emr and L. Hicke (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 389-93.
- Shih, S. C., G. Prag, S. A. Francis, M. A. Sutanto, J. H. Hurley and L. Hicke (2003). A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *Embo J* 22, 273-81.
- Shih, S. C., K. E. Sloper-Mould and L. Hicke (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* 19, 187-98.
- Sloper-Mould, K. E., J. C. Jemc, C. M. Pickart and L. Hicke (2001). Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J Biol Chem* 276, 30483-9.
- Soetens, O., J. O. De Craene and B. Andre (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* 276, 43949-57.
- Spence, J., S. Sadis, A. L. Haas and D. Finley (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15, 1265-73.
- Springael, J. Y. and B. Andre (1998). Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 1253-63.

- Staub, O., I. Gautschi, T. Ishikawa, K. Breitschopf, A. Ciechanover, L. Schild and D. Rotin (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J* 16, 6325-36.
- Steel, G. J., A. J. Laude, A. Boojawan, D. J. Harvey and A. Morgan (1999). Biochemical analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SEC18 gene product: implications for the molecular mechanism of membrane fusion. *Biochemistry* 38, 7764-72.
- Stelter, P. and H. D. Ulrich (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425, 188-91.
- Strack, B., A. Calistri, M. A. Accola, G. Palu and H. G. Gottlinger (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13063-8.
- Strous, G. J., P. van Kerkhof, R. Govers, A. Ciechanover and A. L. Schwartz (1996). The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J* 15, 3806-12.
- Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-8.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn and A. T. Brunger (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-53.
- Swaminathan, S., A. Y. Amerik and M. Hochstrasser (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 2583-94.
- Tang, H. Y., J. Xu and M. Cai (2000). Pan1p, End3p, and S1a1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol Cell Biol* 20, 12-25.
- Terrell, J., S. Shih, R. Dunn and L. Hicke (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* 1, 193-202.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner and C. M. Pickart (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman and P. Walter (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-58.
- Tsurimoto, T. (1999). PCNA binding proteins. *Front Biosci* 4, 849-58.

- Ulrich, H. D. (2003). Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J Biol Chem* 278, 7051-8.
- Ulrich, H. D. (2004). How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle* 3,15-8.
- Ulrich, H. D. and S. Jentsch (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J* 19, 3388-97.
- Urbanowski, J. L. and R. C. Piper (2001). Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole. *Traffic* 2, 622-30.
- van Delft, S., R. Govers, G. J. Strous, A. J. Verkleij and P. M. van Bergen en Henegouwen (1997). Epidermal growth factor induces ubiquitination of Eps15. *J Biol Chem* 272, 14013-6.
- van Nocker, S., S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Cux, I. Wefes, D. Finley and R. D. Vierstra (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* 16, 6020-8.
- VanDemark, A. P., R. M. Hofmann, C. Tsui, C. M. Pickart and C. Wolberger (2001). Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell* 105, 711-20.
- Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze and T. C. Sudhof (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-9.
- Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin and R. J. Deshaies (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-5.
- Vida, T. A. and S. D. Emr (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 128, 779-92.
- Wang, B., S. L. Alam, H. H. Meyer, M. Payne, T. L. Stemmler, D. R. Davis and W. I. Sundquist (2003). Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4. *J Biol Chem* 278, 20225-34.
- Warbrick, E. (2000). The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22, 997-1006.
- Weber, T., B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Sollner and J. E. Rothman (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-72.

- West, M. H. and W. M. Bonner (1980). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res* 8, 4671-80.
- Wiederkehr, A., S. Avaro, C. Prescianotto-Baschong, R. Haguenauer-Tsapis and H. Riezman (2000). The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 149, 397-410.
- Wilkinson, K.D., and Hochstrasser, M. (1998). The deubiquitinating enzymes. in: *Ubiquitin and the biology of the cell*. Plenum Press, 99-120.
- Wilson, D. W., C. A. Wilcox, G. C. Flynn, E. Chen, W. J. Kuang, W. J. Henzel, M. R. Block, A. Ullrich and J. E. Rothman (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339, 355-9.
- Xie, Y. and A. Varshavsky (1999). The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *Embo J* 18, 6832-44.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-7.
- Ye, Y., H. H. Meyer and T. A. Rapoport (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-6.
- Ye, Y., H. H. Meyer and T. A. Rapoport (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 162, 71-84.
- Ye, Y., Y. Shibata, C. Yun, D. Ron and T. A. Rapoport (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-7.
- Yee, N. S., C. W. Hsiau, H. Serve, K. Vosseller and P. Besmer (1994). Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 269, 31991-8.
- Zhu, Y., M. Carroll, F. R. Papa, M. Hochstrasser and A. D. D'Andrea (1996). DUB-1, a deubiquitinating enzyme with growth-suppressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3275-9.

Lebenslauf Edith Oberhofer

geboren am 29.4.1971
in Dornbirn/Österreich
1 Kind, geboren am 18.9.2003

AUSBILDUNG

- 2000-2004 **Doktorarbeit** am Max Planck Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Zellbiologie (Prof. Jentsch) in Martinsried/München zum Thema „Ubiquitin-Modifikation der Synaptobrevine SNC1/SNC2 in *Saccharomyces cerevisiae*“.
Abgeschlossen im Dezember 2004 an der Ludwig-Maximilian Universität München mit der Note 2.
- 1991-1998 **Biologie Diplom**, Studienzweig Mikrobiologie mit den Schwerpunkten Genetik und Biochemie an der Karl-Franzens-Universität und der Technischen Universität in Graz/Österreich.
Diplomarbeit zum Thema „Biosynthese von Lipidpartikeln in *Saccharomyces cerevisiae*“ am Institut für Biochemie (Prof. Kohlwein) der Technischen Universität Graz/Österreich.
- 1989-1991 Studium Landschaftsplanung und Landschaftsökologie an der Universität für Bodenkultur, Wien/Österreich, ohne Abschluß.
- 1981-1989 Neusprachliches Bundesgymnasium Dornbirn/Markt, Österreich